

Desenvolvimento de bebida à base de hortofrutícolas e isolado proteico de elevada bioatividade

Miguel Ângelo Beira Salvador

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia alimentar

Orientadores: Doutora Marta Maria Moniz Nogueira de Abreu

Professora Doutora Margarida Gomes Moldão-Martins

Júri:

Presidente: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Marta Maria Moniz de Abreu, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P.

Lisboa, 2019

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que de alguma forma tornaram possível a realização deste trabalho:

Ao Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, na pessoa do Doutor Miguel Pestana, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho.

Gostaria de expressar um especial agradecimento, à minha orientadora Doutora Marta Abreu, pela estupenda orientação e formação que me deu nestes meses, pelo incentivo, dedicação e disponibilidade sempre com um sorriso e boa disposição, acompanhados de ensinamentos que levo para o resto do meu percurso.

À Doutora Cristina Ramos, pelo apoio constante nos ensaios, sempre com energia e disposição contagiantes.

À Professora Doutora Margarida Moldão-Martins, pela sua orientação, pela sugestão do tema, pelas suas correções, disponibilidade e apoio prestado.

À Doutora Elsa Gonçalves, pela pronta disponibilidade e apoio em todos os ensaios de análise sensorial, bem como o seu sentido prático e esclarecimentos na exposição dos resultados.

À Doutora Carla Alegria, pela explicação das técnicas utilizadas neste trabalho e pela prontidão a ajudar sempre que possível.

À empresa CAMPOTEC por ter facultado as matérias-primas necessárias à realização deste trabalho.

À responsável técnica da Unidade de Microbiologia Alimentar da UTI / INIAV, Dra. Cristina Aleixo e técnicas de laboratório, Maria do Carmo Paulo e Ana Maria Magalhães, pela colaboração na realização das análises microbiológicas.

A todos os participantes do painel sensorial, pelo contributo que forneceram a este trabalho. Devo também agradecer a todos os meus amigos e colegas que me acompanharam neste trajeto, cada um enfrentando os seus desafios, mas sempre com uma ligação de companheirismo e sentido de entreeajuda.

Aos meus pais, sem os quais nada disto seria possível, que sempre fizeram tudo para me garantir o melhor futuro possível assim como me deram todas as oportunidades para chegar mais longe.

Ao meu irmão Guilherme Salvador pelo amor incondicional que só um irmão sabe ter, que olha para mim com admiração e me faz querer ser sempre o melhor ser humano possível.

Ao meu irmão Pedro Salvador pelos conselhos, pela compreensão e pela revisão e apoio ao meu trabalho.

Ao Tristão Câmara Pestana, por ter sido o meu motor impulsionador nesta etapa da minha vida, sempre preocupado com o meu futuro e bem-estar, de quem posso sempre esperar conselhos, apoio, confiança e carinho quando mais preciso.

MUITO OBRIGADO

RESUMO E PALAVRAS CHAVE

O desenvolvimento de produtos alimentares com características nutricionais e funcionais de interesse para a saúde e que garantam a sustentabilidade alimentar (redução do desperdício) representa uma tendência atual a que o consumidor é sensível. As bebidas de hortofrutícolas (HF) com introdução de proteínas de soro de leite enquadram-se neste conceito considerando a combinação complementar de compostos fornecida pelos HF e pelo soro de leite no enriquecimento do *status* bioativo do produto resultante. Este trabalho teve por objetivo desenvolver uma formulação de polpa, com mistura de vários HF e introdução de isolado proteico (soro de leite), de tonalidade verde, sensorialmente aceitável e de elevada bioatividade. Nas formulações testadas foi considerada a utilização de frutos que em Portugal, correspondem a excedentes agrícolas (maçã e pera), bem como, a introdução de isolado proteico (IP) proveniente do soro como forma de promover valorização de subprodutos (economia circular). Os hortícolas, espinafre e salsa, testados nas formulações (5 e 10 %), responsáveis pela cor verde da polpa, revelaram-se importantes na estabilização oxidativa da mistura de frutos (maçã, pera e ananás) e no respetivo incremento fenólico. As polpas selecionadas com introdução de 5% salsa, com e sem isolado proteico (S5 e S5+IP) obtiveram aceitação sensorial superior (aroma) face à utilização do espinafre. As condições de pasteurização otimizadas (90°C/10 min) permitiram a redução da contaminação inicial (α . de 2-3 ciclos LogUFC.g⁻¹ Mic. 30 °C), a inibição de 90% da atividade da PPO, sem alteração significativa do teor fenólico total e manutenção da aceitação sensorial. A avaliação da qualidade das polpas otimizadas (S5 e S5+IP) revelou o cumprimento dos critérios microbiológicos (<2 ciclos LogUFC.g⁻¹ para Mic. 30 °C) durante 30 dias (5°C). No entanto, a polpa S5 obteve níveis de aceitação sensorial superiores face à polpa S5+IP, estimando-se em consequência períodos de vida útil de 30 e 13 dias, respetivamente.

polpas; bioatividade; subprodutos, isolado proteico; soro; formulações; pasteurização.

ABSTRACT AND KEYWORDS

The development of food products with high nutritional and functional values for human health combined with food sustainability and waste reduction awareness set up the major drivers of innovation and technological progress to fulfill consumer needs and wants. Fruit and vegetable beverages (FV) with whey protein introduction fall into this concept when considering the complementary combination of compounds provided by both for enriching the bioactive status of the resulting product. The objective of this study was to develop a pulp formulation, with a mixture of several FV and whey protein isolate with high bioactivity and sensory acceptance. The tested formulations considered the use of fruits that correspond in Portugal to agricultural surpluses (apple and pear), as well as the introduction of whey to promote valorization of byproducts (circular economy). The vegetables, spinach and parsley, tested in the formulations (5 and 10%), responsible for the green color of the pulp, have proved to be important in the oxidative stabilization of the fruit mixture (apple, pear and pineapple) and to the increase of phenolic compounds. The optimized pulps (Id:S5; 5% parsley), with and without protein isolate added (S5 and S5 + IP) received positive sensory acceptance (aroma). The optimized pasteurization condition (90 °C / 10 min) has allowed the reduction of initial contamination (ca. 2-3 cycles Log UFC.g⁻¹ Mic. 30°C), the inhibition of 90% of PPO activity, the maintenance of total phenolic content and the pulp sensory acceptance levels. The quality evaluation of the

optimized pulps (S5 and S5 + IP) revealed the fulfillment of the microbiological criteria (≤ 2 Log UFC.g⁻¹ for Mic. 30 °C) up to 30 days (5 °C). However, the S5 pulp obtained higher sensory scores compared to the S5 + IP pulp, corresponding to a shelf life of 30 and 13 days, respectively.

pulps; by-products; whey protein isolate; formulations; pasteurization.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO E PALAVRAS CHAVE.....	v
ABSTRACT AND KEYWORDS	v
ÍNDICE DE TABELAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1 Benefícios do consumo de hortofrutícolas.....	1
1.1 Composição nutricional e funcional	1
1.1.1 Compostos fenólicos.....	2
1.1.2 Carotenoides	2
1.1.3 Clorofila	4
2 Subproduto soro de leite.....	6
2.1 Caracterização geral da composição nutricional e funcional.....	7
2.2 Valorização do soro e componentes do soro.....	8
3 Polpas de Hortofrutícolas	8
3.1 Fabrico de polpas.....	10
3.2 Alterações da qualidade dos hortofrutícolas	11
3.2.1 Alterações Físico-Químicas e Enzimáticas.....	11
3.2.2 Deterioração Microbiológica	12
3.3 Tratamentos de conservação	12
3.3.1 Pasteurização.....	13
3.3.2 Alta pressão hidrostática.....	14
3.3.3 Conservação química	14
3.3.4 Refrigeração	15
3.3.5 Congelação	15
DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	17
4 Descrição de Material e Métodos	17

4.1	Matérias-primas	17
4.2	Procedimentos Tecnológicos	17
4.2.1	Preparação das polpas	17
4.2.2	Pasteurização.....	18
4.3	Métodos analíticos	18
4.3.1	Determinação de pH	18
4.3.2	Determinação de Teor de Sólidos Solúveis	18
4.3.3	Determinação da Atividade Enzimática da Peroxidase (POD).....	19
4.3.4	Determinação de Compostos Fenólicos Totais	19
4.3.5	Determinação de Cor CIELab.....	19
4.3.6	Determinação do comportamento reológico.....	21
4.3.7	Determinação de Microrganismos Aeróbios a 30 °C.....	21
4.3.8	Análise Sensorial por painel de provadores	21
4.4	Descrição dos métodos estatísticos	22
5	Desenvolvimento de polpas de HF com adição de isolado proteico de soro	22
5.1	Estudos de otimização da formulação	23
5.1.1	Objetivo.....	23
5.1.2	Descrição da metodologia (ensaio 1 e 2)	23
5.1.3	Resultados Ensaio 1	26
5.1.4	Resultados Ensaio 2	31
5.1.4.1	<i>pH e TSS</i>	31
5.1.5	Conclusão parcial	37
5.2	Estudo das condições de pasteurização térmica.....	38
5.2.1	Objetivo.....	38
5.2.2	Descrição da metodologia.....	38
5.2.3	Resultados	39
5.2.4	Conclusão parcial	44
5.3	Estudo da estabilidade da formulação otimizada, com e sem introdução de proteínas de soro, em condições de refrigeração (5°C)	45

5.3.1	Objetivo.....	45
5.3.2	Descrição da metodologia.....	45
5.3.3	Resultados.....	45
5.3.4	Conclusão parcial.....	56
6	Conclusões Gerais.....	57
7	Referências bibliográficas.....	60
ANEXOS.....		I
Anexo A - Folha de prova utilizada nos ensaios de pasteurização e de armazenamento		I
Anexo B – Gráficos referentes à análise sensorial do ensaio de armazenamento		I

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de aditivos usados na indústria alimentar. (og.safemed.pt)	15
Tabela 2 - Classificação do grau de diferenças pelo valor de TCD (Drlange 1994)	21
Tabela 3 – Proporção de mistura dos HF testados nas formulações do ensaio 1	25
Tabela 4 – Teor fenólico total (mg eq, ác gálico*100 g ⁻¹) e valores de pH e TSS das amostras (valores médios± DP).	27
Tabela 5- Registo fotográfico das amostras de Controlo, E5, E10, S5 e S10, após fabrico e ao final de 3 dias à temperatura ambiente (21°C).	30
Tabela 6 – Valores médios (± DP) de pH e TSS (°Brix) das polpas E10 e S5 com (TT) e sem tratamento térmico de pasteurização.	31
Tabela 7 – Variação dos parâmetros de cor nas amostras de E10 e S5 com e sem tratamento térmico (90 °C/10 min).	32
Tabela 8 – Registo fotográfico das amostras de E10 e S5 com e sem tratamento térmico, após fabrico e ao final de 24h armazenagem (5°C),	33
Tabela 9 – Atividade da POD nas amostras de E10 e S5 com e sem tratamento térmico (90 °C/10 min).	35
Tabela 10 – Binómios temperatura/tempo testados na pasteurização	39
Tabela 11 – Parâmetros cinéticos para a alteração da tonalidade (h*) nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura e tempo de pasteurização.	42
Tabela 12– Parâmetros cinéticos para a inativação da POD (%) nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura e tempo de pasteurização.	43
Tabela 13 – Evolução dos registos fotográficos nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	48
Tabela 14 – Evolução dos Índice de aceitabilidade das amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	52
Tabela 15 – Coeficientes das variáveis para os fatores 1 e 2 (variáveis significativas assinaladas a vermelho).	54
Tabela 16 - Componentes principais, respetivos eigenvalues e percentagens da variância total explicada por cada um dos componentes.	54
Tabela 17–Consistência e índice de escoamento para as amostras S5 e S5+IP no dia 0.	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Compostos fenólicos. (http://www.wanderinglifestyles.com)	2
Figura 2 – Estrutura química dos carotenoides. (http://www.scielo.br)	3
Figura 3 – Clivagem do β -caroteno. (https://www.researchgate.net)	3
Figura 4 – Estrutura ácido ascórbico. (https://www.acidoascorbico.net)	4
Figura 5 – Estrutura clorofila a e b. (http://descobrindociencia.blogspot.com)	5
Figura 6 - Degradação da clorofila a. (http://www.scielo.br)	6
Figura 7- Diagrama tecnológico geral de processamento de polpas de frutos.	10
Figura 8 - Reação de oxidação dos fenóis pela PPO. (https://www.researchgate.net/)	11
Figura 9 - Diagrama de processamento das polpas de HF.	18
Figura 10 - Tonalidade de cor correspondente ao ângulo $^{\circ}h$ (0 – 360 $^{\circ}$). (Fonte: http://www.dtpstudio.de/english/raldesign.html .)	20
Figura 11- Apresentação sequencial dos estudos realizados neste trabalho.....	23
Figura 12- Apresentação sequencial dos estudos realizados neste trabalho.....	23
Figura 13- Preparação das amostras de polpas do Ensaio 1.	24
Figura 14- Preparação das amostras de polpas do Ensaio 2	26
Figura 15 - Valores médios da tonalidade h° das amostras E5, E10, S5, S10 e na formulação base (controlo), avaliados ao longo do tempo (à temperatura ambiente).....	28
Figura 16 - Valores médios do índice de escurecimento WI das amostras E5, E10, S5, S10 e na formulação base (controlo), avaliados ao longo do tempo (à temperatura ambiente).	29
Figura 17 – Teor de fenólico total (CFT) das amostras E10 e S5 com e sem tratamento térmico. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey). Barras verticais correspondem a 95% confiança.	34
Figura 18- Contagens de microrganismos a 30 $^{\circ}C$ (Log (UFC/g) avaliados nas amostras E10 e S5 com e sem tratamento térmico. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey). Barras verticais correspondem a 95% confiança.	35
Figura 19- Efeitos da aplicação de tratamento térmico (90 $^{\circ}C$ /10 min) e da introdução de isolado proteico (IP) no índice de consistência (k) da formulação S5. Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey (p=0.05). Barras verticais correspondem a 95% confiança	36
Figura 20- Efeitos da aplicação de tratamento térmico (90 $^{\circ}C$ /10 min) e da introdução de isolado proteico (IP) no índice de escoamento (n) da formulação S5. Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey (p=0.05).	37
Figura 21 – Indicação da fase de estudo.	38
Figura 22- Diagrama do ensaio de pasteurização.....	39
Figura 23 – Valores de pH das amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização (independentemente do tempo de pasteurização). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey (p=0.05).....	40
Figura 24 – Valores de TSS das amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização (independentemente do tempo de pasteurização). Barras verticais correspondem a 95% de confiança. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey).	40
Figura 25 – CFT de amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização (independentemente do tempo de pasteurização). Barras verticais correspondem a 95% de confiança. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey).	41
Figura 26 – Alteração da tonalidade (h^*) nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização.	42

Figura 27 – Alteração da cromaticidade (C^*) das amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura e tempo de pasteurização.	43
Figura 28 – Valores de POD (%) avaliado nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização.	44
Figura 29 - Indicação da fase de estudo.	45
Figura 30 – Valores médios do TSS avaliados nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).	46
Figura 31 - Valores médios do pH nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).	46
Figura 32- Evolução do CFT nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	47
Figura 33 - Evolução do índice de escurecimento (WI) nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	48
A evolução da tonalidade (h^*) e da cromaticidade (c^*) nos dois tipos de amostras (S5, S5+IP), refletem, respetivamente a alteração da cor verde para tons mais acastanhados (diminuição dos valores h^*) e o aumento da sujidade da cor (diminuição dos valores c^*). No entanto, as respetivas taxas de degradação foram semelhantes sendo a diferença entre amostras atribuída às diferenças obtidas nos valores iniciais (tempo 0).	48
Figura 34 - Evolução da tonalidade h° nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	49
Figura 35 - Evolução cromaticidade nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	49
Figura 36 - Evolução das diferenças totais da cor (TCD) nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	50
Figura 37 - Atividade residual da POD nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).	50
Figura 38 (a e b) - Evolução das contagens Microbiológicas (Mic. 30°C; ciclos Log (UFC.g ⁻¹)) nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).	51
Figura 39 – Classificações sensoriais para os atributos (aparência, cor, consistência, aroma/sabor, e apreciação global) atribuídas às amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).	52
Figura 40 – Dendograma das amostras (S5 e S5+IP).	53
Figura 41 - Projeção espacial das amostras (S5 e S5+IP), no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.	55
Figura 42 - Projeção espacial dos atributos avaliados nas amostras (S5 e S5+IP), no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.	56

LISTA DE ABREVIATURAS

Ác.	Ácido
Ad.	Adaptado de.
a_w	Atividade da água
ca	Cerca
cf.	Conforme
CFT	Conteúdo fenólico total
DP	Desvio padrão
E5	Formulação espinafre 5%
E10	Formulação espinafre 10%
Ea	Energia de ativação
Eq.	Equação
FAO	Food and Agricultural Organization
HF	Hortofrutícolas
Id._Amostras	Identificação de amostras
INIAV	Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária
IP	Isolado proteico
k	Índice de consistência
Micro 30 °C	Microrganismos aeróbios a 30 °C
n	Índice de escoamento
NMP	Número mais provável
POD	Enzima peroxidase (POD, EC 1.11.1.7)
PPO	Enzima polifenoloxidase (PPO, EC 1.10.3.1)
rpm	Rotações por minuto
S5	Formulação salsa 5%
S10	Formulação salsa 10%
TCD	Diferença total de cor (<i>total colour difference</i>)
TSS	Teor em sólidos solúveis
TT	Tratamentos térmicos

UFC

Unidades formadoras de colónias

UTI

Unidade de Tecnologia e Investigação

ENQUADRAMENTO GERAL

Na atualidade é constatada uma procura crescente por produtos alimentares de origem vegetal com características nutricionais e funcionais de interesse para a saúde, apresentando o setor das bebidas, em particular, um crescimento muito significativo (Fortitech 2011).

Esta tendência de mercado justifica-se pelo grau de exigência do consumidor atualmente motivado pelos seguintes aspetos: seletividade na aquisição de produtos alimentares de produção industrial em função dos ingredientes que entram na respetiva composição; incremento no consumo de produtos hortofrutícolas frescos; atenção dada a questões éticas e ambientais. As bebidas de hortofrutícolas (HF) com introdução de proteínas de soro de leite enquadram-se neste conceito tendo em conta que a combinação complementar de compostos fornecida pelos hortofrutícolas (HF) e pelo soro de leite, enriquece o status nutricional e funcional do produto resultante. No que se refere à importância para uma dieta saudável os hortofrutícolas (HF) caracterizam-se por apresentarem elevada densidade nutricional/funcional, e um baixo conteúdo energético, possuindo uma diversidade de nutrientes (açúcares, minerais, aminoácidos, fibras) e fitoquímicos bioativos (compostos fenólicos, fibras, vitaminas e minerais). No entanto, nos HF, o aporte proteico é reduzido acrescentando o facto das proteínas de origem vegetal possuírem valor biológico inferior comparadas com as proteínas de origem animal. Assim, e em complementaridade, o soro, subproduto da indústria do queijo, pode constituir uma fonte de proteínas de baixo custo cujas propriedades funcionais e nutricionais particulares, parte atribuídas à presença de aminoácidos essenciais contendo enxofre (cistina, metionina), podem acrescer à qualidade nutricional do produto quando em mistura com os HF. Este subproduto apresenta inúmeras potencialidades de valorização na indústria alimentar quer pela sua composição nutricional, biológica e funcional quer pela disponibilidade deste subproduto em que são caracterizados industrialmente volumes elevados. Em Portugal estima-se um desperdício de cerca de 440 milhões de litros de soro pelas indústrias de lacticínios nos Açores.

Este trabalho teve por objetivo geral o desenvolvimento de um protótipo de polpas com mistura de vários HF com introdução de proteínas de soro, de tonalidade verde, com vista a obter uma bebida funcional sensorialmente aceitável e sem adição de aditivos de síntese e conservantes. Nas formulações testadas pretende-se a utilização de maçã e de pera por forma a promover a utilização de frutos que no nosso país correspondem a excedentes agrícolas, e desta forma contribuir para a respetiva valorização. Neste tipo de produto a dinâmica da conservação assenta na otimização da formulação que obtenha aceitação sensorial, na dependência direta das características intrínsecas dos HF em mistura, em associação com a aplicação de tratamentos de pasteurização térmica, por forma a garantir a necessária estabilidade enzimática e microbiológica durante a armazenagem em refrigeração (5°C).

Na prossecução do objetivo geral foram realizados os seguintes estudos:

1. Estudos de otimização da formulação

Foi testada a mistura de vários hortofrutícolas (ananás, maçã, pera, espinafre e salsa) e, diferentes proporções (salsa, espinafre), com vista a obter a solução que cumprisse em simultâneo dois requisitos: estabilidade do pigmento verde e boa aceitação sensorial.

2. Estudo das condições de pasteurização térmica

Foram testados diferentes binómios temperatura / tempo com vista a caracterizar os efeitos da aplicação de calor na alteração da cor, na atividade da enzima peroxidase e, na composição fenólica. Para a seleção do tratamento térmico foram utilizados os

seguintes critérios: estabilidade enzimática (eliminação de > 90% atividade da peroxidase), eliminação da microbiota de contaminação vegetativa, maximização da composição fenólica e aceitação sensorial do produto após tratamento.

3. Estudo da estabilidade da formulação otimizada

Estabilidade da formulação otimizada, com e sem introdução de proteínas de soro (isolado proteico), em condições de refrigeração. Foram avaliados dois tipos de polpas (formulação otimizada, com e sem introdução do isolado proteico de soro), submetidos à condição de pasteurização térmica selecionada durante o armazenamento refrigeração (ca de 30 dias; 5°C) face a parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais com vista a estimar o período de vida útil.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 Benefícios do consumo de hortofrutícolas

Os hortofrutícolas (HF) incluem hortícolas (raízes, caules e folhas, inflorescências, rebentos, tubérculos ou bolbos) e frutos (com e sem semente). Os HF caracterizam-se por serem tecidos vivos que permanecem metabolicamente ativos, após serem colhidos, o que os torna extremamente perecíveis manifestando alterações contínuas das suas características, maioritariamente indesejáveis, pelo grau de afastamento à qualidade inicial em fresco (Noa 2012).

O consumo de HF é considerado um aspeto crucial para uma alimentação saudável, sendo que o seu consumo diário tem um papel importante na prevenção de diversas doenças graves (cardíaca, cancro, diabetes e obesidade) (OMS, 2006). Além disso, a OMS refere, igualmente, que o baixo consumo de hortofrutícolas é um dos principais fatores de risco para a mortalidade em todo o mundo, recomendando um consumo diário de pelo menos 400 g de HF. Na prevenção do desenvolvimento de doenças participam compostos com atividade antioxidante presentes nos HF, como vitaminas, compostos fenólicos, carotenoides, esteróis, glucosinolatos e saponinas (Souza 2011).

Existem inúmeros estudos que atestam benefícios diversificados para a saúde e bem-estar diretamente relacionados com o consumo de HF. Nomeadamente, foi provado que indivíduos que consomem diariamente 5 ou mais peças de HF diminuem para metade o risco de desenvolvimento de uma grande variedade de tipos de cancro, particularmente os do trato gastrointestinal (Dembitsky et al. 2011). Outros estudos indicam que consumir frutos ricos em compostos fenólicos é importante por veicularem muitos compostos antioxidantes, sendo que quando consumidos com alimentos ricos em gorduras, contribuem para minimizar os efeitos negativos destes (Regis 2015). São disso exemplos, o kiwis e os frutos vermelhos, cujo consumo contribuiu para baixar os níveis de triglicéridos no sangue em cerca de 15% (Dembitsky et al. 2011). Há também evidências de os HF têm um papel importante na prevenção e tratamento de diferentes doenças do foro cardiovascular. Uma dieta rica em fibra e compostos fenólicos melhora o metabolismo lipídico, prevenindo a oxidação de colesterol de baixa densidade, importante na prevenção de aterosclerose (Souza 2017).

1.1 Composição nutricional e funcional

Os HF são considerados uma boa fonte de vitaminas e minerais e compostos bioativos, nomeadamente pigmentos, flavonoides, açúcares, esteróis, e ácidos gordos. São frequentemente associados a propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas, antimicrobiana, anti proliferativa, anti neuro degenerativa, glicémica e controlo de peso, cardio protetora e neuro protetor (Neri-Numa et al. 2018).

No caso das vitaminas, os HF apresentam grande variedade de vitaminas hidrossolúveis, como as vitaminas do complexo B (ácido fólico, ácido nicotínico, vitaminas B₉ B₃) e a vitamina C (ácido ascórbico). São também uma importante fonte de precursores da vitamina A como o β -caroteno. Nos HF a componente mineral, é igualmente importante nomeadamente para os minerais como: K, Na, Ca, Mg, Fe, Mn, Al, P e Cl.

Outro aspeto importante dos HF como parte integrante de uma alimentação saudável é a sua composição antioxidante, que desempenha um papel importante na manutenção da saúde,

prevenindo danos provocados por espécies reativas de oxigênio. Isto torna-os alimentos funcionais, sendo definido por alimento funcional todo o alimento que produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos na saúde, quando consumidos com frequência e acompanhados por hábitos saudáveis (Hassimotto et al. 2009). Dentro dos compostos bioativos, destacam-se nos HF os compostos fenólicos, os carotenoides, o ácido ascórbico e as fibras.

1.1.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos (CF) ou polifenóis são caracterizados por ser um vasto grupo de fitoquímicos, abrangendo mais de 8000 compostos distintos, que possuem pelo menos um anel aromático ligado a um ou mais grupos hidroxilo (-OH) (Figura 1). A maioria destes compostos ocorre na natureza conjugados a mono- ou oligossacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos. Presentes na maioria das plantas como parte integrante da sua estrutura, os CF localizam-se maioritariamente nos vacúolos e desempenham diversas funções de estruturação nos tecidos, de sustentação ou proteção, de defesa da planta contra predadores ou agentes patogénicos, assim como na proteção em casos de condições extremas de radiação, temperatura ou stresse hídrico e nutricional (Neves 2015). Tomam parte também no desenvolvimento de pigmentos e compostos voláteis que estão diretamente interligados com as características organoléticas de cada planta, contribuindo ativamente para a perceção da cor, sabor e aroma, em função do tipo e teores presentes. Como por exemplo, uma maior concentração de ácido ascórbico confere à planta maior capacidade antioxidante. Desta forma, é correto salientar a sua importância para a estabilidade oxidativa e características organoléticas dos HF. Agrupando-se em 4 grupos principais: ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides e taninos.(Evans et al. 1997).

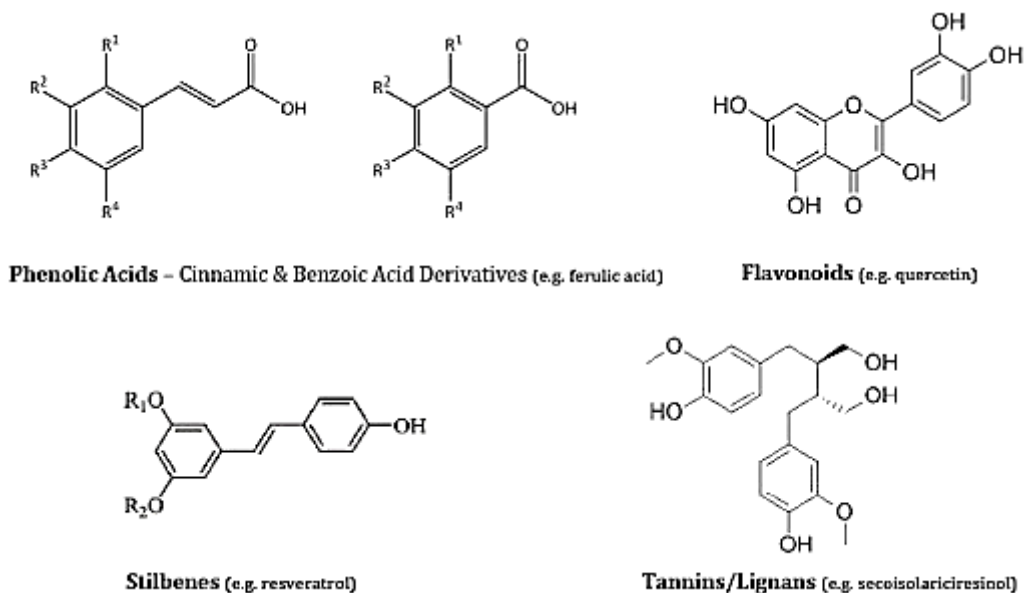


Figura 1 – Compostos fenólicos. (<http://www.wanderinglifestyles.com>)

1.1.2 Carotenoides

Os carotenoides são uma classe de pigmentos apenas sintetizados por plantas, presentes em concentrações elevadas nos HF, como por exemplo na cenoura, na abóbora e na beterraba.

Estes pigmentos conferem aos HF cores como o amarelo, o laranja, o vermelho e o violeta. Dos 600 carotenoides existentes na natureza, apenas de 30 a 40 deles estão presentes na nossa alimentação (Horst et al. 2009). Os carotenoides estão divididos em grupos consoante a sua composição química: carotenos (eg. α -, β - e γ -caroteno e licopeno) e xantofilas (eg. luteína, zeaxantina, β -criptoxantina e capsantina) (Figura 2). Sendo que os β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina, luteína, zeaxantina e licopeno os responsáveis pelas suas concentrações no plasma (Horst et al. 2009).

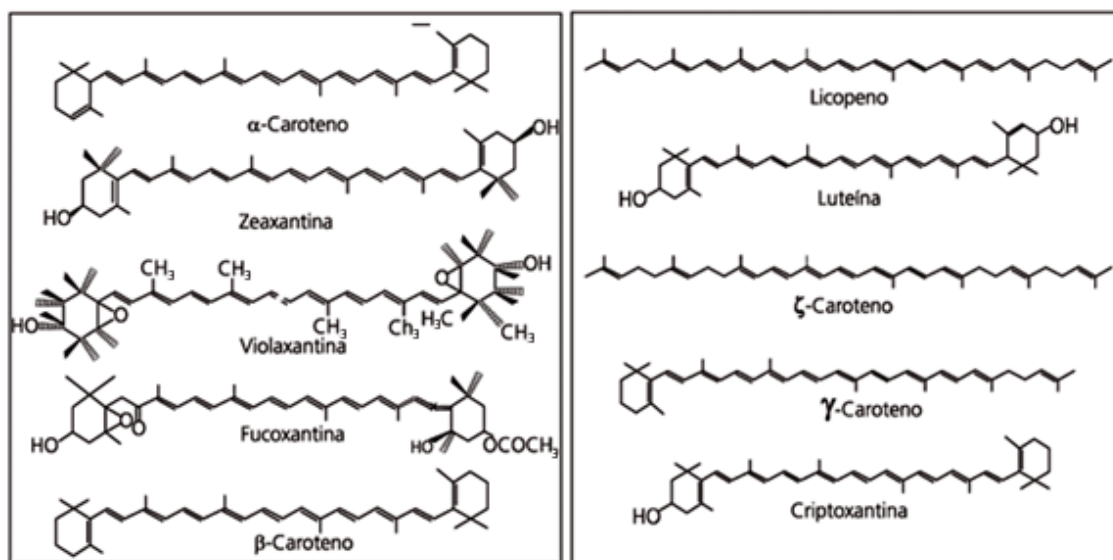


Figura 2 – Estrutura química dos carotenoides. (<http://www.scielo.br>)

Carotenoides são os compostos bioativos amplamente utilizados no desenvolvimento de produtos alimentares enriquecidos, devido às suas propriedades como precursor da vitamina A, isto é, quando ingeridos, o α -caroteno, o β -caroteno e o γ -caroteno, são convertidos em vitamina A (retinol) (Figura 3) (Stahl et al. 2005). Destacam-se também devido à capacidade antioxidante associada a prevenção de doenças crónicas não transmissíveis como cancro de pulmão, pele e próstata e de patologias de foro cardiovascular (Stahl et al. 2005).

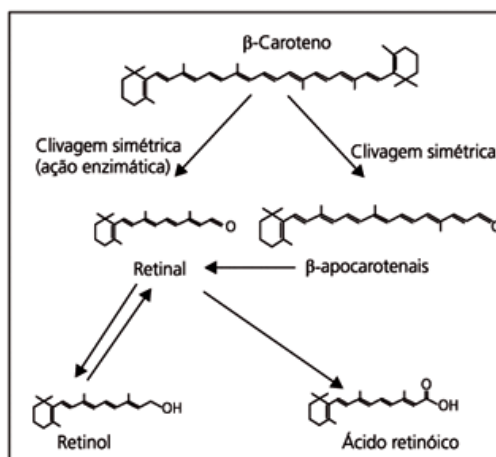


Figura 3 – Clivagem do β -caroteno. (<https://www.researchgate.net>)

1.1.2.1 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico (Figura 4) conhecido com vitamina C, é de elevada importância como antioxidante devido ao elevado poder redutor, que participa em reações metabólicas e processos de reparação. Presente em maiores concentrações nos frutos ácidos como os citrinos, o ananás e morangos. Tem um papel importante na prevenção do stress oxidativo devido à sua capacidade de captura de espécies reativas de oxigénio (radicais livres) (Rucker 2008).

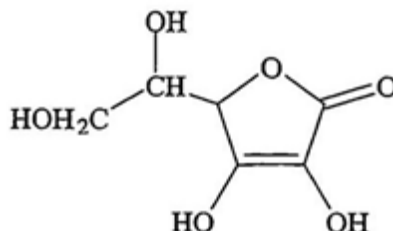


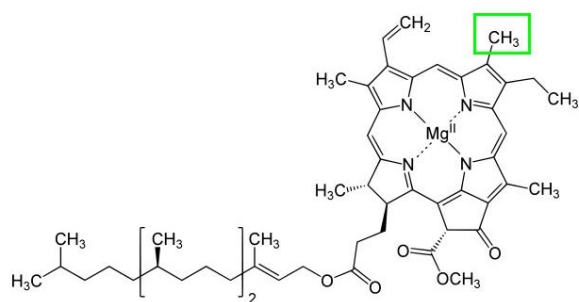
Figura 4 – Estrutura ácido ascórbico. (<https://www.acidoascorbico.net>)

O ácido ascórbico tem também um papel fundamental na biossíntese de colagénio e determinados neurotransmissores. Para além disso tem ainda a capacidade de regenerar outros antioxidantes tais como a Vitamina E, e de estimular o sistema imunitário aumentando a sua força de proteção no organismo humano. Estas características conferem-lhe propriedades anti-inflamatórias, estimulante imunológico, antiviral e antibacteriano (Sorice et al. 2014).

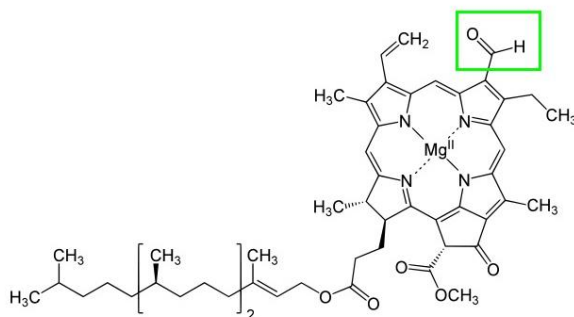
1.1.3 Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes no reino vegetal, estando presentes nos cloroplastos das folhas e noutros tecidos vegetais. As clorofilas são distinguidas entre a e b (Figura 5), e porfirinas são as mais usadas como corante natural. Em solução, a clorofila a apresenta uma cor azul-esverdeada, enquanto a clorofila b apresenta uma cor amarelo-esverdeado. A sua quantificação pode ser feita por métodos de espectrofotometria, fluorimetria e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os solventes orgânicos mais polares, como acetona, metanol, etanol, acetato de etilo e piridina são os mais eficazes para a extração completa das clorofilas devido às suas ligações fracas (não covalentes) (Maria Streit et al. 2005).

Em termos de estabilidade as clorofilas são relativamente sensíveis à luz, calor, oxigénio e à degradação química. As diferenças aparentes na cor do vegetal são devidas à presença de outros pigmentos associados, como os carotenoides, onde a sua razão nas plantas é de cerca de 5:1, sendo que grande parte é degradada nos primeiros dias que seguem a morte do organismo.



CLOROFILA A



CLOROFILA B

Figura 5 – Estrutura clorofila a e b. (<http://descobrindociencia.blogspot.com>)

A razão aparente da instabilidade das porfirinas-Mg é que, no seu estado excitado são fortes agentes redutores e, por isso, rapidamente oxidáveis. Estudos encontraram vários intermediários da oxidação da clorofila que sugerem que o anel ciclopentanona seja o primeiro a ser atacado. Neste sentido, para atenuar a degradação, as clorofilas podem ser modificadas antes de serem incorporadas nos alimentos, substituindo-se o Mg^{+2} pelo Cu^{+2} (Couto 2016).

Para manter a coloração natural do pigmento e mantê-lo estável, foram determinadas condições que apresentam uma menor oxidação, entre estas: pH maiores que 7, ausência de oxigênio e luz. O pH básico torna a clorofila mais estável ao calor, quando comparada ao pH ácido. Assim como a presença de íons positivos minimiza a permeabilidade da membrana das células diminuindo a degradação das clorofilas.

A instabilidade da clorofila é assinalada pela alteração da sua cor e suas qualidades nutritivas. A perda de coloração verde da clorofila para uma cor castanha azeitona, durante o armazenamento sob refrigeração ou congelamento, é atribuída à formação da feofitina. Este fenômeno é conhecido como feofitinação (Figura 6), onde o Mg^{+2} presente no anel é substituído por H^{+} . Devido às taxas que levam à reação de feofitinação serem, geralmente, mais elevadas que outras vias de degradação da clorofila, elas são consideradas o mecanismo mais importante de destruição da clorofila durante o processamento de alimentos (Schiozer et al. 2007).

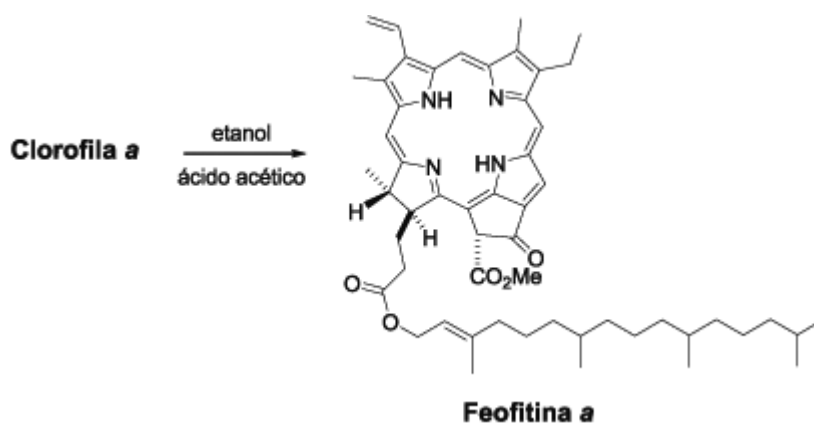


Figura 6 - Degradação da clorofila a. (<http://www.scielo.br>)

2 Subproduto soro de leite

De todo o leite produzido em Portugal, grande parte é utilizado no fabrico de queijo. Na sua produção são geradas grandes quantidades de soro como subproduto. Em Portugal, a maioria das indústrias de lacticínios não contempla ainda a fase de valorização de resíduos, o que agrava os problemas ambientais deste sector, tendo em conta a rejeição de grandes quantidades de soro de leite (Ferraz 1998). Apesar dos avanços na utilização do soro durante a última década, uma grande parte do soro produzido é ainda eliminado como efluente. Eliminar o soro por esta via é não somente contra a lei ambiental em vigor, como também representa um desperdício de nutrientes, uma vez o soro na sua composição inclui uma fonte interessante de vitaminas, minerais e energia. O principal problema ambiental na eliminação deste efluente líquido atribui-se, em particular, à elevada carga orgânica apresentada (elevado BOD), sendo por isso considerado um dos poluentes mais potentes dentro dos efluentes da indústria alimentar (Silva et al. 2000). Os efluentes líquidos gerados pelas indústrias de lacticínios caracterizam-se também por apresentarem variações cíclicas tanto a nível dos caudais como das suas características, nomeadamente quanto ao valor de pH, devido às fases de lavagem que utilizam alternadamente soluções ácidas e alcalinas (Ferraz 1998).

Embora tenham sido criadas alternativas de utilização para este subproduto, como a produção de requeijão ou aproveitamento da água e/ou proteína presente no soro, há um ainda grande excedente de que pode ser valorizado (Spadoti et al. 2009). Anualmente são produzidos a nível mundial cerca de 145 milhões de toneladas de soro, estimando-se em Portugal um desperdício de cerca de 440 milhões de litros de soro pelas indústrias de lacticínios nos Açores (Miranda 2018). Este facto justifica a continua investigação dedicada a processos inovadores para recuperar o soro e aplicá-lo em formulações alimentares, com vista a acrescentar valor a este subproduto e diminuir os impactos ambientais.

Estão em desenvolvimento alguns projetos, com contornos empresariais e que englobam diversas gamas de produtos visando o aproveitamento do soro para a produção de produtos de maior valor acrescentado do que o soro em pó. Neste âmbito são referidas inúmeras aplicações na indústria alimentar, nomeadamente a sua incorporação em sopas desidratadas, molhos para saladas, alimentos infantis, dietéticos e geriátricos, produtos de panificação, queijos e confeitaria.

2.1 Caracterização geral da composição nutricional e funcional

O interesse neste subproduto deve-se sobretudo às suas propriedades nutricionais e funcionais. Em termos gerais a composição do soro retém cerca de 55% dos nutrientes do leite, incluindo proteínas (4-6 gramas por litro) (Kosikowski 1979), cujas propriedades funcionais e nutricionais particulares são atribuídas à presença de aminoácidos essenciais contendo enxofre (cistina, metionina) (Spadoti et al. 2009).

O soro pode apresentar gosto variável, ligeiramente ácido ou doce, dependendo do tipo de leite e do processo de fabrico do queijo que lhe deu origem (Teixeira et al. 2007). Em média contém 93% a 94% de humidade; 0,3% a 0,5% de gorduras; 0,8% a 1,0% de proteínas; 4,5% a 5,0% de lactose; 0,5% a 0,7% de minerais; 0,1% de ácido láctico, além de outros componentes em quantidades residuais (Firmino 2010). Alguns componentes não-proteicos como oligossacáridos e esfingolípido são ainda considerados ingredientes de valor acrescentado com potencial de utilização em alimentos funcionais.

Para a saúde humana, a composição do soro, nomeadamente em lactoglobulina, α -lactalbumina, lactoferrina, imunoglobulinas, entre outras proteínas secundárias; incluindo proteases e peptonas, contribui favoravelmente para o aumento da imunidade, modulação de processos digestivos e metabólicos e, como fatores de crescimento, para diferentes tipos de células, tecidos e órgãos. Para além dessas funcionalidades, as proteínas do soro são altamente digeríveis e rapidamente absorvidas pelo organismo, estimulando a síntese de proteínas sanguíneas e tecidulares (Sgarbieri 2004).

A lactoferrina (péptido derivado da lactoferrina) é um dos péptidos com maior atividade antimicrobiana reconhecida. Recentemente outras proteínas tais como α -Lactalbumina e β -lactoglobulina são referidas como potenciais precursoras de fragmentos bactericidas. Estes péptidos demonstraram atividade contra o desenvolvimento de um largo espectro de microrganismos patogénicos, nomeadamente *Escherichia sp*, *Helicobacter sp*, *Listeria sp*, *Salmonella sp* e *Staphylococcus sp*, bem como de leveduras e fungos filamentosos (Haque et al. 2008). Na ótica da indústria alimentar, esta potencial atividade conservante tem sido alvo de investigação recente, nomeadamente na incorporação de soro (em natureza e concentrado) em revestimentos comestíveis (filmes) configurando outra vertente para a sua valorização.

A estrutura globular das proteínas do soro com pontes de dissulfureto, conferem-lhe estabilidade estrutural. Na sua constituição a β -lactoglobulina, representa aproximadamente 50% do teor total da proteína. A cadeia de β -lactoglobulina possui vários pontos de ligação para minerais, vitaminas lipossolúveis e lípidios, estes pontos de ligação podem ser usados para incorporar compostos lipofílicos desejáveis como tocoferol e vitamina A. A α -lactalbumina representa aproximadamente 25% do teor total de proteínas do soro. A adição de α -lactalbumina tem sido defendida como forma de “humanizar” fórmulas infantis e outros produtos devido à sua semelhança à proteína encontrada no leite humano. A albumina do soro bovino e as imunoglobulinas são consideradas proteínas secundárias por estarem presentes em quantidades muito pequenas. A albumina do soro bovino liga ácidos gordos e outras moléculas pequenas. Enquanto que as imunoglobulinas incluem IgG1, IgG2, IgA e IgM e estas proteínas reforçam a imunidade passiva de crianças e outros consumidores (Walzem 1999).

Os péptidos biologicamente ativos (bioativos) presentes no soro têm variações em tamanho, peso molecular e funções, e podem produzir vários efeitos bioquímicos e fisiológicos no corpo humano. Temos como exemplo a lactoferrina e a lactoperoxidase, a primeira é uma proteína

com a capacidade de ligar e transportar ferro promovendo a absorção de ferro no organismo, sendo por isso usada no continente asiático em fórmulas infantis. Há estudos que ligam este péptido ao fortalecimento do sistema imunitário, prevenção de cancro e doenças não específicas da glândula mamária. Para além disso também tem efeito antioxidante e atividade bacteriostática protegendo o organismo contra o crescimento e a proliferação de microrganismos intestinais patogênicos.

A segunda, é uma enzima que degrada o peróxido de hidrogênio. Este composto com atividade antibacteriana tem sido objeto de estudos visando a sua utilização como conservante natural e como estabilizador do desenvolvimento da acidez e mudanças de pH em iogurte.

O glicomacropéptido, está presente em soro após a degradação da caseína e pode suprimir o apetite, alterar a produção de pigmentos pelos melanócitos, atua como probiótico e tem atividade imunomoduladora (Haraguchi et al. 2008).

O soro representa assim uma fonte variada de minerais (elevado teor de cálcio), hidratos de carbono e proteínas de qualidade e valor biológico elevados. As características das proteínas do soro, conhecidas na comunidade do fitness como *whey protein*, possuem elevado valor nutricional e de fácil digestão e o seu perfil de aminoácidos essenciais atende ou supera todas as exigências qualitativas e quantitativas estabelecidas pela FAO e OMS (Haraguchi et al. 2008).

A composição do soro apresenta ainda propriedades de grande utilidade em termos tecnológicos. A título exemplificativo destaca-se a presença de enzimas com propriedades higroscópicas e de gelificação. O açúcar presente, a lactose, pelo elevado poder de absorção de água e afinidade com alguns compostos, configura-se como bom fixador de cor e aromas. As imunoglobulinas e proteínas tais como a lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima, presentes no soro, possuem atividade antimicrobiana.

2.2 Valorização do soro e componentes do soro

Pelo exposto anteriormente o soro do leite representa um ingrediente muito promissor a ser utilizado na formulação de alimentos funcionais. O aparecimento e desenvolvimento de novas tecnologias, tais como a ultra e a microfiltração, aplicadas à indústria de laticínios, contribuíram não só para resolver o problema ambiental associado ao resíduo gerado na produção de soro, mas também para a obtenção de uma gama diversificada de produtos de interesse comercial como o soro em pó, concentrados e isolados proteicos de soro (IPS) (Rodrigues 2015).

Os isolados proteicos, produtos obtidos através de processos de separação por membranas ou por cromatografia de permuta iónica (catiónica ou aniónica), podem apresentar teor proteico muito elevados (70 - 90%). Consoante os processos de concentração utilizados obtêm-se isolados proteicos (IPS) com diferentes propriedades, onde a principal diferença refere-se ao teor em glicomacropéptido (Teixeira 2003). Devido ao teor proteico elevado e às propriedades funcionais e tecnológicas associadas, o IPS é usado em diferentes formulações alimentares, nomeadamente como substituto da clara do ovo, ou utilizado em bebidas tendo em conta a sua elevada solubilidade e excelentes propriedades organoléticas (Teixeira 2003).

3 Polpas de Hortofrutícolas

A procura por alimentos de conveniência (de fácil utilização), com maior tempo de conservação e de elevado valor nutricional e funcional, constitui na atualidade uma tendência de consumo

dominante. Para a acompanhar, a indústria alimentar tem-se focado na produção de alimentos cujo processamento envolva a utilização conjugada de tratamentos de baixa intensidade com vista à respetiva retenção das características nutricionais, funcionais e sensoriais em fresco. No caso da indústria de hortofrutícolas a componente de consumo mais prática é muitas vezes alcançada pela processamento dos HF em polpas.

O processamento dos HF em polpas obtém-se a partir de operações tecnológicas simples envolvendo a trituração da parte comestível dos mesmos, após descasque e descaroçamento (quando necessário) com aplicação posterior de métodos de conservação (Ramos et al. 2007), nomeadamente pasteurização térmica e/ou a conservação química (utilização de conservantes e antioxidantes sintéticos).

Neste sentido, nos últimos anos a produção e comercialização de polpas de frutos tem aumentado, seja em produtos para consumo final (estabilizados à temperatura ambiente, refrigerado ou congelado) seja como produto intermédio para utilização posterior na indústria de produção de sumos, néctares, sobremesas, entre outros. Este tipo de aproveitamento tecnológico permite ainda gerir com mais eficácia económica as grandes quantidades de frutos concentradas em determinados períodos de colheita (sazonalidade) em que os preços da matéria-prima são mais favoráveis, disponibilizando os produtos noutras épocas (Costa et al. 2013).

No mercado a crescente procura de polpas deve-se também à crescente consciencialização do consumidor relativamente aos fatores que contribuem para estilos de vida saudável associados ao consumo de alimentos saudáveis e *in natura*. Segundo estudos realizados na Europa foi evidenciado que, em geral, tanto os consumidores em casa como na restauração, dão preferência a vegetais frescos ou às alternativas processadas/congeladas, pela perceção de que os alimentos frescos preservam melhor o sabor e são mais saudáveis (sem adição de conservantes, sal ou açúcar). No entanto, no mercado, os produtos congelados apresentam vantagens competitivas sobre os produtos frescos, na medida em que apresentam períodos de vida útil prolongados (ca de 1 ano), sem terem os problemas associados à elevada perecibilidade dos produtos frescos, nomeadamente, reduzem-se as elevadas quebras de stock. Este tipo de produtos congelados face aos frescos, com preços mais reduzidos tendem neste setor a ocupar uma cota de mercado importante (cerca de 36%) (Ribatejo 2015).

A produção de polpas de frutos permite obter produtos com períodos de vida útil diversificados consoante os tratamentos de conservação a que sujeitam durante o processamento de fabrico (pasteurização, esterilização, congelação) bem como, obter produtos de conveniência (eg. embalagens individuais) garantindo uma qualidade nutricional, funcional e sensorial interessante para a saúde. A possibilidade de utilizar excedentes de frutos e/ou de frutos que não cumprem os critérios para o mercado em fresco (fruta feia ou fora de calibre) é outra vantagem deste tipo de processamento. Esta última questão contribui para a redução do desperdício alimentar, tendo em conta o cenário atual caracterizado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Segundo a mesma foi estimado que nos países desenvolvidos metade da produção alimentar é desperdiçada, ultrapassando valores de 1,3 milhões de toneladas por ano. Os valores em Portugal apontam para cerca de 1 tonelada por ano, ou seja, 17% do que é produzido é desperdiçado (Fruta Feia 2018). Na Europa, a preferência dos consumidores por e HF dentro de critérios normalizados em termos de calibre e cor resulta num desperdício de 30%. Estas exigências de mercado conduzem a elevados desperdícios de matéria-prima que envolveram os mesmos recursos na produção agrícola (energia, terreno e

água). O aproveitamento destas matérias-primas para a produção de alimentos contribui assim para diminuir o desperdício (Fruta Feia 2018).

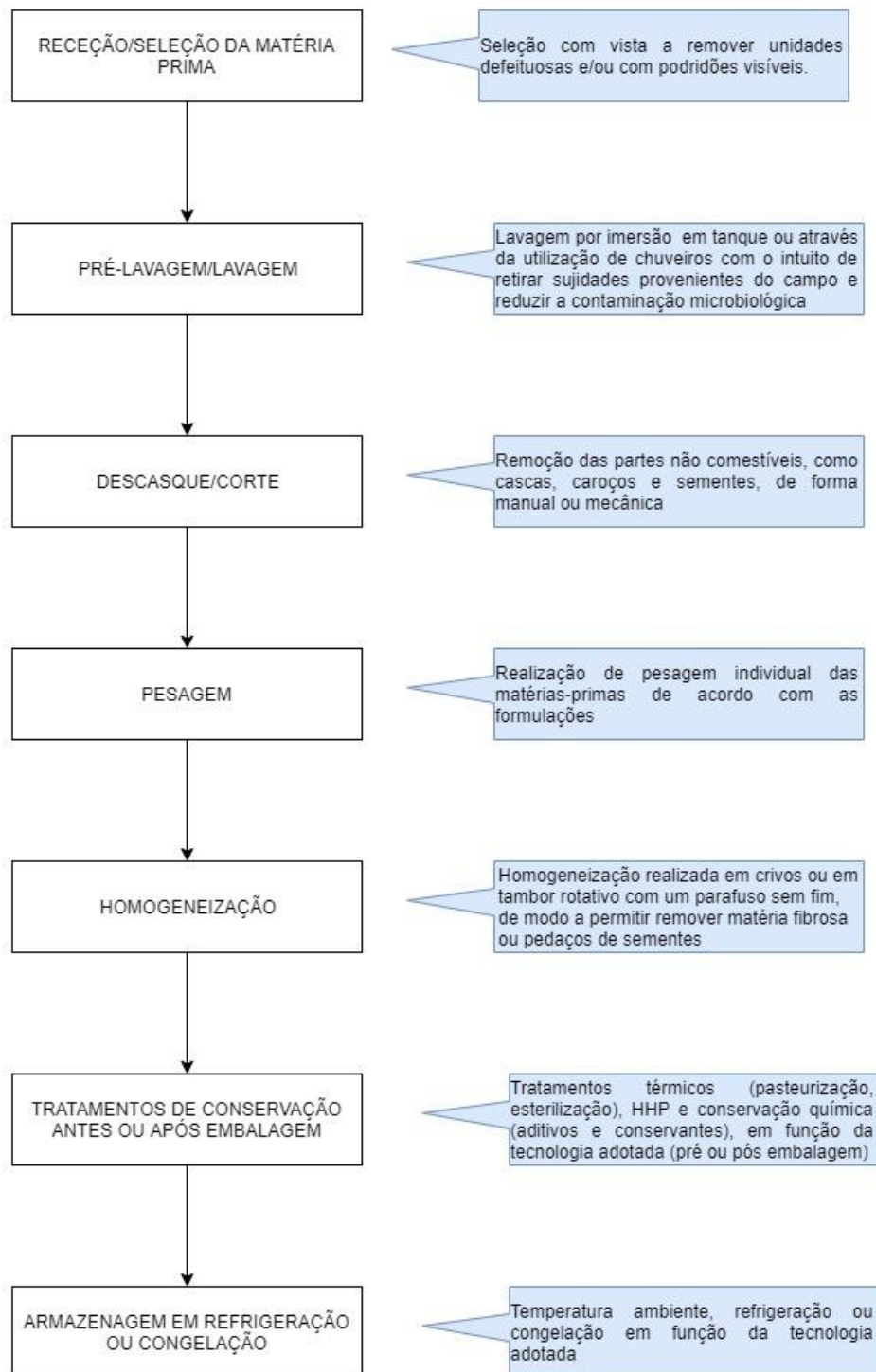


Figura 7- Diagrama tecnológico geral de processamento de polpas de frutos.

3.1 Fabrico de polpas

O processamento tecnológico de polpas de hortofrutícolas incluiu várias de etapas, que podem variar dependendo da tecnologia utilizada pela fábrica, que, quando cumpridas de forma adequada, garantem um produto seguro e de qualidade. Na Figura 7 apresenta-se o diagrama

tecnológico geral de processamento de polpas de hortofrutícolas bem como os objetivos gerais para cada passo do processo de fabrico.

3.2 Alterações da qualidade dos hortofrutícolas

No período pós-colheita, os HF, a manutenção dos processos fisiológicos conduz à alteração das características iniciais da qualidade em fresco. Os danos físicos causados nas operações de preparação dos HF aceleram diversos processos fisiológicos e enzimáticos com consequências na alteração da qualidade inicial. Na sequência destes processos de preparação, verifica-se o aumento da produção de etileno, a elevação da taxa respiratória bem como o incremento das reações bioquímicas responsáveis pelas alterações de cor, textura, sabor e qualidade nutricional. Nas operações de mistura e trituração, ocorre a destruição celular e consequente mistura de conteúdos intracelulares facilitando-se o contato entre enzimas e substratos. Os exsudados celulares constituem, por outro lado, um meio de desenvolvimento microbiano favorável. A partir do momento em que ocorre a rutura celular verificam-se processos rápidos de degradação enzimática e deterioração microbiológica (Kramer et al. 1989). Para prevenir estas alterações são aplicados tratamentos de conservação, nomeadamente, a pasteurização e a refrigeração.

3.2.1 Alterações Físico-Químicas e Enzimáticas

As diferentes reações de oxidação dos compostos nas polpas de HF, nomeadamente de vitaminas entre outros compostos responsáveis pelo aroma e sabor são responsáveis pela depreciação da qualidade sensorial das mesmas. Estas reações são influenciadas pelas condições de processamento e armazenamento utilizadas (utilização de calor, presença de oxigénio, proteção à luz, temperatura).

Uma das principais alterações da qualidade nos HF diz respeito ao escurecimento enzimático. Após a rutura celular em que se promove o contacto das enzimas oxirredutases com os substratos fenólicos na presença de oxigénio. A oxidação dos compostos fenólicos leva à formação de polímeros escuros. Estas reações são acompanhadas com a deterioração de aroma, sabor e diminuição do valor nutricional. As principais enzimas responsáveis por este processo são as oxirredutases, nomeadamente a peroxidase (POD) e polifenol oxidase (PPO) (Santos et al. 2012). A PPO é a principal enzima que participa nas reações de oxidação de compostos fenólicos tal como se apresenta no esquema da Figura 8 (Crumière 2000).

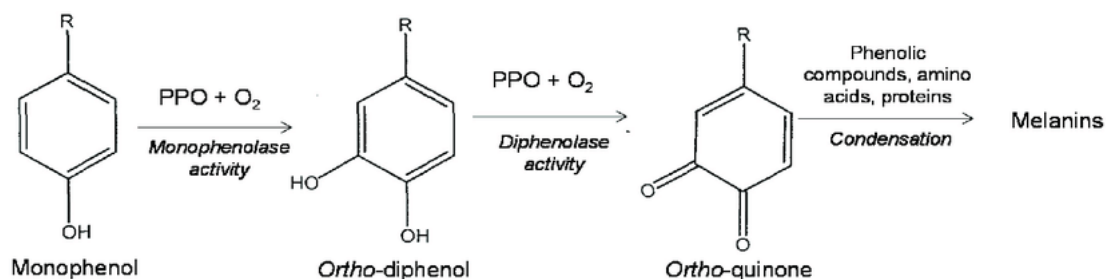


Figura 8 - Reação de oxidação dos fenóis pela PPO. (<https://www.researchgate.net/>)

A POD reage na presença de peróxidos de hidrogénio, catalisando a oxidação de compostos fenólicos, aminas e outros compostos orgânicos. Estas reações estão associadas à formação de aromas desagradáveis, principalmente devido à oxidação de ácidos gordos insaturados,

rancificação e libertação de compostos voláteis. Por ser uma enzima de elevada termo resistência, a POD é utilizada como indicador da eficácia de tratamentos térmicos, e uma vez inativada face à aplicação de uma determinada intensidade térmica considera-se que o mesmo acontece com as restantes enzimas (Martins et al. 1997).

3.2.2 Deterioração Microbiológica

O interior dos HF é praticamente estéril, sendo que a maior parte da microbiota reside na parte exterior. Ao haver rutura da casca facilita-se o acesso dos microrganismos no interior dos tecidos, proporcionando condições favoráveis ao respetivo desenvolvimento. A microbiota mais frequente nos HF inclui os grupos de bolores, leveduras e, das bactérias ácido tolerantes.

No grupo dos bolores destacam-se os géneros *Sclerotinia*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Phoma* e *Rhizopus* (Nguyen-The e Carlin, 1994). No que diz respeito às leveduras, os géneros mais comuns são *Candida spp.*, *Cryptococcus spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Trichosporon spp.*, *Pichia spp.* e *Toruslaspora spp.*, (Guerzoni e Marchetti, 1987). É também possível que as polpas de HF veiculem microrganismos patogénicos como como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli*, *Entamoeba histolytica*, *Ascaris*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* entre outros, embora seja pouco comum.

A elevada acidez destes alimentos, atribuída à presença de ácidos orgânicos, confere aos frutos valores de pH na gama de 2,0 a 4,5. Este intervalo restringe o desenvolvimento de microrganismos patogénicos, sendo por isso considerados produtos de relativa segurança microbiológica. Por outro lado, nos hortícolas o elevado teor de hidratos de carbono, os elevados valores de atividade da água (a_w) e pH com carácter mais básico ($pH > 4,5$), são favoráveis ao desenvolvimento de bactérias (Santos et al. 2008).

Estes microrganismos são provenientes da manipulação e processamento pós colheita a que a matéria prima é submetida, dependendo da origem, das práticas de cultivo, das condições higiénicas no processamento e do equipamento utilizado e do armazenamento e embalagem.

Nas polpas uma das principais causas de deterioração é o desenvolvimento de bolores e leveduras pela invasão secundária dos tecidos ou pela via fermentativa, para além de apresentarem também a capacidade de produzir micotoxinas com efeitos mutagénicos e cancerígenos no organismo, colocando em causa a saúde dos consumidores. Segundo a legislação brasileira, encontram-se estabelecidos limites máximos para microrganismos totais a 30 °C de, respetivamente, 5×10^3 UFC/g e de 2×10^3 UFC/g para polpas conservadas à temperatura ambiente e em refrigeração (5 °C). Como indicador de segurança de saúde pública, a presença de microrganismos patogénicos é avaliada pela determinação de *Salmonella* (que se pretende ausente em 25 g de produto). Para controlar a qualidade higiénico-sanitária, é usado como indicador os níveis de coliformes fecais, em que as contagens máximas admitidas a 45 °C não devem exceder 1,0 NMP/g (Brasil Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento 2000).

3.3 Tratamentos de conservação

O escurecimento das polpas de HF e o desenvolvimento de sabores/aromas indesejáveis, são as principais causas de rejeição do produto. Os tratamentos de conservação visam a preservação dos seus componentes nutricionais e sensoriais (cor, sabor, aroma, consistência), assim como a prevenção de desenvolvimento microbiano excessivo. O facto de não haver um tratamento singular que garanta a conservação do produto sem comprometer a sua qualidade, e o

consumidor dar preferência a produtos sem a adição de aditivos e conservantes, a opção mais adequada passa pela aplicação de tecnologia de barreiras (Alexandre et al. 2004). Isto é, a combinação de vários tratamentos de conservação, de intensidade ligeira, de modo a manter a qualidade sensorial e a estabilidade microbiológica e oxidativa das polpas. De acordo com o tipo de produto e a durabilidade pretendida, tecnologias que utilizam a aplicação de calor (ex. pasteurização), e a aplicação de frio (ex. congelação e/ou a refrigeração), têm sido bastante utilizadas devido à sua eficiência quando utilizadas em simultâneo.

3.3.1 Pasteurização

Para estabilizar alimentos o processo mais utilizado é o tratamento térmico, dado a sua capacidade de eliminar microrganismos e inativar enzimas. No entanto a aplicação de calor excessivo altera significativamente a qualidade sensorial dos alimentos promovendo igualmente alteração dos seus constituintes. Segundo um estudo realizado em diferentes Brássicas, estes tratamentos utilizam valores de temperatura na gama de 50 °C a 100 °C durante períodos variáveis de 10 a 30 minutos (Roy et al. 2007).

A pasteurização é um tratamento térmico que consiste na aplicação de calor, normalmente para valores inferiores a 100 °C, com vista à inativação enzimática e à eliminação de células vegetativas (formas não esporuladas) de microrganismos de deterioração e patogénicos. Para o ajuste dos binómios tempo/temperatura, específico a cada alimento, é considerada a preservação do valor nutritivo, funcional e das características sensoriais (Fellows 2000).

Para cumprir os objetivos pretendidos (inativação microbiologia e enzimática ou de outros nutrientes termo sensíveis como as vitaminas sem comprometer os compostos de aroma e sabor) os binómios temperatura / tempo utilizados nos tratamentos de pasteurização devem ser otimizados para cada formulação de polpa em particular. A eficiência do tratamento dependente ainda de diversos fatores como a embalagem (dimensão, material da embalagem, disposição no aparelho), a fonte de calor (água quente, vapor ou radiação ionizante), as características físico-químicas dos HF (viscosidade, taxa de transferência de calor, pH), contaminação microbiológica inicial e resistência térmica dos microrganismos e enzimas presentes no produto (Freitas et al. 2000).

Na indústria alimentar a pasteurização pode ser aplicada de duas formas a temperaturas baixas e longos intervalos de tempo denominando-se pasteurização LTLT (*Low Temperature Long Time*), ou, pasteurização HTST (*High Temperature Short Time*), isto é, a temperaturas elevadas durante curtos períodos. Existe uma variação da HTST denominada pasteurização ultrarrápida (UHT - *Ultra High Temperature*) onde são aplicadas temperaturas ainda mais elevadas (>100 °C) por períodos muito curtos (2 a 10 segundos).

Na indústria as polpas de HF os processos de pasteurização podem ocorrer antes ou depois da embalagem. No caso de se realizarem antes da embalagem podem ser usados pasteurizadores tubulares, seguidos de sistema de enchimento assético para prevenir a contaminação do produto (Carla et al. 2008). No produto pasteurizado após a embalagem o processo pode ser realizado pela imersão das embalagens em tanques com controlo de temperatura (banhos de temperatura regulada). Para evitar a ocorrência de sobreaquecimentos, tem de se garantir que a aplicação de é semelhante em todos os pontos do produto. Nesse sentido o tamanho e medidas da embalagem, assim como as características de penetração de calor no produto devem ser testadas caso a caso.

3.3.2 Alta pressão hidrostática

A investigação na área alimentar aposta no desenvolvimento de métodos que permitam inativar os microrganismos indesejáveis comprometendo ao mínimo a composição nutricional e aromática. A tecnologia de altas pressões hidrostáticas ou HHP (*High Hydrostatic Pressures*) na indústria alimentar é um processo emergente aplicado para controlo de qualidade, aumento do tempo da *shelf-life* dos produtos, e preservação de nutrientes. Um grande número de produtos comerciais como carnes fatiadas, vegetais, molhos, sumos de fruta, marisco, e outros alimentos prontos para consumo refrigerados são processados através da utilização de HHP e estão disponíveis a nível mundial (Rosenthal et al. 2016).

Processos de alta pressão (*High Pressure Processing*) referem-se ao tratamento a tratamentos nos quais se submetem alimentos a elevadas pressões na gama de 100-900 MPa. Nos sistemas industriais as pressões utilizadas situam-se normalmente na gama de 400 a 700 MPa. Com este processo consegue a inativação das formas vegetativas de microrganismos com reduções de 5 ciclos logarítmicos aplicando pressões hidrostáticas conjugada com aplicação moderada de calor, valores de temperatura inicial de 60 °C (1-15 min), dependendo do produto e requisitos. Com a redução da pressão a temperatura do produto volta imediatamente ao valor inicial. Esta capacidade de *fast cooling* é de grande interesse para produção de alimentos de elevada qualidade com maior retenção dos nutrientes e com características sensoriais próximas do estado em fresco. O HHP é o tratamento mais utilizado em produtos muito suscetíveis a perdas de constituintes induzidas pelo o calor (Juliano et al. 2010). O método de alta pressão hidrostática, realizado num espaço confinado e usando a água como meio de transmissão, funciona através da aplicação de pressão de igual modo em todas as direções, o que permite aos sólidos a retenção de seu formato original. Tem como base o princípio de Le Chatelier, segundo o qual, qualquer reação química, mudança de conformação molecular, ou transição de fase, é acompanhada por uma diminuição do volume, que será favorecido em altas pressões. O Princípio isostático associado implica que a pressão é transmitida de uniformemente e quase de forma instantânea através da amostra biológica, tornando o processo de pressurização independente do volume e da forma da amostra, ao contrário do processo térmico (Brites et al. 2010).

3.3.3 Conservação química

Para auxiliar o processamento industrial e manter a qualidade dos produtos em termos de conservação, textura e sabor, podem ser utilizados no processamento aditivos alimentares (Tabela 1). Apesar dos efeitos de conservação e no aumento do período de vida útil, a utilização de aditivos na indústria alimentar não está isenta de problemas, em parte porque se desconhece o efeito de alguns deles no organismo humano. Por estes motivos os consumidores dão preferência a alimentos com redução ou mesmo isentos de conservação química. Por conseguinte, a sua utilização está sujeita a legislação específica e a controlos de qualidade regulares (Marques 2011).

Tabela 1 - Exemplos de aditivos usados na indústria alimentar. (og.safemed.pt)

N.º de código E	Grupo de ingredientes alimentares	Exemplo
100	Corantes	Curcumina 
200	Conservantes	Ácido Sórbico 
300	Antioxidantes e reguladores de acidez	Ácido Ascórbico 
400	Espessantes, estabilizantes, gelificantes e emulsionantes	Ácido Algínico 
500	Agentes que modulam características físicas	Carbonatos de Sódio 
901	Agente de revestimento	Cera de Abelhas 

Dentro dos aditivos temos os compostos sulfurados que têm sido utilizados para redução do escurecimento enzimático de vegetais minimamente processados. A cisteína tem sido utilizada na conservação de banana maçãs e batatas. O ácido ascórbico é reconhecido pela sua ação antioxidante e contribuição nutricional. Este é um dos principais antioxidantes utilizados em HF, com o objetivo de prevenir reações de escurecimento entre outras reações oxidativas, utilizado em batatas, abacaxis, peras, entre outros (Melo et al. 2009).

3.3.4 Refrigeração

Na conservação pelo frio os alimentos ficam submetidos a valores de temperatura na gama 0° a 5°C o que permite controlar os diferentes mecanismos de deterioração, nomeadamente o desenvolvimento microbiano e a atividade enzimática. Isto ocorre porque a atividade microbiana e enzimática é normalmente favorecida a valores de temperatura superior à da refrigeração. Tanto a temperatura como a humidade do ar no interior das câmaras de refrigeração devem ser controladas, de modo a prevenir oscilações, e ajustadas em função do tipo de produto. Neste sentido é importante controlar a circulação do ar no interior das câmaras por forma a garantir uma distribuição uniforme de frio.

Ao longo do ciclo de produção (armazenamento das matérias-primas, processamento, armazenagem e distribuição /venda) é desejável que se mantenham níveis de temperatura baixa (Martins 2007).

3.3.5 Congelação

O período de vida útil de produtos refrigerados é limitado a alguns dias. Por outro lado, a congelação efetuada a temperaturas mais baixas (-1 ° a -18 °C), leva à conservação do produto, por períodos mais longos (meses).

A congelação de polpas de HF, visa essencialmente prolongar o período de vida útil do produto, preservando a sua qualidade, através da inibição dos processos de deterioração anteriormente referidos. Trata-se de uma operação na qual a temperatura de um alimento (calor sensível) é reduzida abaixo do seu ponto de fusão, de modo a proporcionar uma mudança de estado físico da água, com formação de cristais de gelo. Esta redução de temperatura conduz a uma limitação do desenvolvimento microbiano e minimização de reações enzimáticas e oxidativas, devido à imobilização de água sob a forma de gelo (diminuição da atividade da água no alimento) (Barbin et al. 2009).

Na indústria alimentar existem diversos métodos de congelação que variam de acordo com a velocidade de congelação pretendida e as especificações do produto em causa, dependente ainda das dimensões, forma, tipo de embalagem (se aplicável). Assim, os métodos utilizados podem ser congelação por circulação de ar forçado, congelação por contacto, imersão ou aspersão em líquidos e congelação criogénica (Silva 2016).

No sistema de congelação com circulação de ar forçado (-40°C), este circula de forma paralela ou perpendicular em torno dos alimentos, garantindo uma distribuição uniforme. Quanto mais baixa for a temperatura de congelação menor é a taxa de reacção de degradação dos produtos e mais rápida a congelação. Este processo pode ser aplicado em equipamentos de funcionamento contínuo (ex. túnel isolado termicamente onde passam carros de tabuleiros ou tapetes rolantes) ou em descontínuo (ex. carros de tabuleiros colocados em salas). Entre os processos realizados em descontínuo estão os de congelação de polpas de frutas embaladas em sacos plásticos de polietileno (Afonso et al. 1997).

DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

4 Descrição de Material e Métodos

4.1 Matérias-primas

Os hortofrutícolas (HF) utilizados no desenvolvimento experimental deste estudo foram fornecidos pela empresa CAMPOTEC, S.A, no âmbito do projeto Grupo Operacional ProEnergy - Novos produtos alimentares e bioenergia a partir de frutos de baixo valor comercial e resíduos agroindustriais (PDR2020-1.0.1-FEADER 031865).

Foram utilizados os seguintes HF: pera Rocha (*Pyrus communis* L. variedade Rocha), ananás (*Ananas sativus*), maçã Fuji (*Malus domestica* L. variedade Fuji), salsa (*Petroselinum crispum*) e espinafre (*Spinacea oleracea*). Após a receção das matérias-primas, foi realizada uma seleção para eliminar unidades defeituosas (com danos ou podridões visíveis e/ou estados de maturação muito avançados) seguindo-se a armazenagem em condições de refrigeração ($5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, câmara frigorífica aux 210 P/3 iberna), até utilização nos respetivos ensaios, num prazo máximo de uma semana.

4.2 Procedimentos Tecnológicos

4.2.1 Preparação das polpas

A preparação das polpas foi realizada na oficina tecnológica do INIAV (Unidade de Tecnologia e Inovação - UTI) tendo-se realizado uma higienização prévia das bancadas de trabalho, facas, equipamentos e recipientes, através de uma lavagem e desinfecção com solução de etanol a 70%, de forma a prevenir contaminações durante o processamento. Os operadores/manipuladores seguiram igualmente uma conduta de higiene adequada.

Para a elaboração das polpas efetuou-se uma pré-lavagem das matérias-primas. A salsa e o espinafre foram lavados em água corrente seguindo-se a secagem (papel absorvente). Os frutos foram descascados e cortados em quartos, manualmente com facas (aço inox), mergulhados em água fria e secos com papel absorvente. Seguiram-se as pesagens individuais (Balança RADWAG PS 3500/C/1 – Wagi Elektroniczne) de acordo com as formulações estabelecidas (1kg). A mistura e homogeneização foram executadas numa Bimby (Thermomix 31-1 Vorwerk Germany) a uma velocidade 10200 rpm durante 1 minuto.

A polpa obtida, foi embalada em sacos de plástico de uso alimentar (polietileno de baixa densidade; dimensão 11 cm x 13 cm) em porções de 100 g cada, devidamente identificados. Após retirar o ar, da cabeça de embalagem, os sacos foram termosoldados (Tish-400 impulse sealer, Tew Electric Heating Equipment Co, Ltd., Taipei, Taiwan) e colocados de imediato em banho de gelo fundente. O diagrama de preparação das polpas apresenta-se esquematizado na Figura 9.

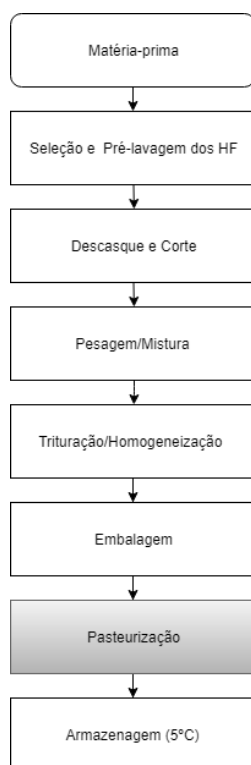


Figura 9 - Diagrama de processamento das polpas de HF.

4.2.2 Pasteurização

O tratamento de pasteurização foi efetuado após a embalagem das polpas através da imersão dos sacos (amostras de *ca* de 100 g cada), em banhos com controlo de temperatura (Hakhe N2, termoestatizados e com agitação e Marmitta eletrónica talsa MECA 120 L). Na monitorização da temperatura ao longo dos tratamentos de pasteurização foram utilizados termopares do tipo T (Ellab CMC.RP). Os tempos de tratamento foram contabilizados a partir do momento em que as amostras foram imersas nos banhos de água.

Após cada condição de pasteurização, os produtos embalados foram de imediato arrefecidos por imersão em banho de gelo fundente (*ca* de 5 min) e secos (papel absorvente), seguindo para armazenagem ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$); até serem utilizados para análise.

4.3 Métodos analíticos

4.3.1 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada de acordo com a norma portuguesa NP EN 1132 (1996), com recurso ao potenciómetro (Crison Micro pH 2001, Espanha), previamente calibrado a $21\text{ }^{\circ}\text{C}$, com soluções tampão de pH=4 e pH=7. Os valores médios de pH resultaram de 3 determinações por amostra.

4.3.2 Determinação de Teor de Sólidos Solúveis

O procedimento foi realizado de acordo com a norma portuguesa NP EN 12 143 (1999). O teor de sólidos solúveis (TSS) foi determinado através do refratómetro (ATAGO PR-201

Refractometer), a partir sumo obtido diretamente da polpa. Os resultados são expressos em °Brix, representando a percentagem de sólidos solúveis por 100 g de produto, resultantes de 3 determinações por amostra.

4.3.3 Determinação da Atividade Enzimática da Peroxidase (POD)

A técnica para a determinação da atividade enzimática da POD foi adaptada de Bifani et al. (2002). As modificações introduzidas deveram-se ao facto de se ter verificado a necessidade de concentrar o extrato enzimático de forma a garantir a reprodutibilidade e repetibilidade da técnica. Decorrente deste facto, foram otimizadas as condições de extração e doseamento espectrofotométrico para garantir a estequiometria da reação enzimática durante 40 segundos. Após otimização, estabeleceu-se a concentração de substrato a utilizar para a determinação da atividade enzimática da POD, sendo esta de 44,5 mM de peróxido de hidrogénio e de 44,7 mM de guaiacol, para um extrato enzimático obtido nas condições de mistura polpa: solução de NaCl 1 M de 1:4 (p:v). Após obtenção do extrato enzimático (sobrenadante) por centrifugação (Sorvall Instruments DU PONT RC5C à temperatura de 4 °C), fez-se reagir uma alíquota deste com 3 mL de substrato (44,5 mM H₂O₂, 44,7 mM Guaiacol em 0,1 M tampão fosfato, pH=7), perfazendo um volume total de 3,2 mL. Os resultados são expressos pela variação de 1 unidade de absorvância ao comprimento de onda de $\lambda=470$ nm (espectrofotómetro Jasco V-530 UV/VIS) por minuto por mililitro (U/ml), nas condições de ensaio. Os resultados médios foram obtidos a partir de triplicados da amostra.

4.3.4 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A determinação de compostos fenólicos totais é baseada na reação colorimétrica promovida pelo reagente *Folin-Ciocalteu* de acordo com Swain and Hillis (1959). A preparação do extrato fenólico é efetuada pela mistura de 1:4 (p:v) de polpa e metanol (100%). O processo de extração compreende um período de espera do homogeneizado *overnight* a 5 °C. Para obtenção do extrato fenólico segue-se uma centrifugação 10000 rpm x 30 min (Sorvall Instruments DU PONT RC5C; 4 °C) e armazenou-se o sobrenadante (extrato fenólico) a 5 °C. Para o doseamento efetuou-se a mistura, em tubos de 5 mL, de 2400 µl de água destilada com 150 µl de extrato metanólico e 150 µl de reagente *Folin-Ciocalteu* (0,25 N). Agitou-se a mistura e após 3 min adicionou-se 300 µl de carbonato de sódio (1 N) sob agitação tendo-se seguido um período de espera de 2 horas no escuro e à temperatura ambiente. Efetuam-se as leituras espectrofotométricas a $\lambda=725$ nm (espectrofotómetro Jasco V-530 UV/VIS). Os cálculos basearam-se na interpolação dos valores de absorvância utilizando uma curva de calibração de com ácido gálico (0.004-0.600 mg/ml). Os resultados médios foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por 100g de produto (mgEAG.100 g⁻¹) a partir dos replicados das amostras.

4.3.5 Determinação de Cor CIELab

A cor das polpas foi avaliada com recurso ao colorímetro Minolta CR 300 (Osaka, Japão), no sistema CIELab, (iluminante C), tendo a calibração sido efetuada a partir do padrão de referência branco (L*=97,10; a*=0,19; b*=1,95). Para cada replicado da amostra foram efetuadas 6 medições. No sistema CIE, o valor de L* representa a luminosidade e traduz a variação de escuro/claro, em que 0 equivale a preto e 100 a branco. O valor a* varia de vermelho (+60) a verde (-60) e o valor b* varia de amarelo (+60) a azul (-60). As coordenadas a* e b* aproximam-se de 0 para cores neutras (branco, cinzento e preto). A partir destes parâmetros foram ainda

calculados os seguintes parâmetros: saturação ou cromaticidade da cor, valor C^* , a tonalidade $^{\circ}h$ (Hue), o índice de escurecimento (WI) e, a diferença total de cor TCD (Total Color Difference). A Cromaticidade C^* (Eq. 1) é uma medida do Croma ou da saturação da cor e representa a distância ao eixo neutro. O parâmetro $^{\circ}h$ (Eq. 2 a Eq. 4) traduz a tonalidade da cor e pode ser definido como o ângulo (0 - 360 $^{\circ}$) (ver Figura 10). Os ângulos formados variam pelos eixos dos parâmetros a^* e b^* , definindo assim a tonalidade da cor, sendo que os ângulos entre 0 $^{\circ}$ e 90 $^{\circ}$ correspondem aos vermelhos, laranjas e amarelos; de 90 $^{\circ}$ a 180 $^{\circ}$ os amarelos, amarelo-verdes e verdes; de 180 $^{\circ}$ a 270 $^{\circ}$ os verdes, cianos e azuis; de 270 $^{\circ}$ a 360 $^{\circ}$ os azuis, púrpuras, magentas e novamente os vermelhos (Schanda 2007).

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$^{\circ}h = \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360 \quad (\text{Eq. 2})$$

, se $a^* > 0$ e $b^* > 0$

$$^{\circ}h = 180 + \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360 \quad (\text{Eq. 3})$$

, se $a^* < 0$

$$^{\circ}h = 360 + \frac{\left(\arctg \frac{b^*}{a^*} \right)}{6.2832} \times 360 \quad (\text{Eq. 4})$$

, se $a^* > 0$ e $b^* < 0$



Figura 10 - Tonalidade de cor correspondente ao ângulo $^{\circ}h$ (0 – 360 $^{\circ}$). (Fonte: <http://www.dtpstudio.de/english/raldesign.html>.)

Segundo Boun and Huxsoll (1991), o índice de escurecimento (*Whiteness Index*, WI) é o parâmetro que traduz a maior ou menor presença de branco da amostra, sendo calculado pela seguinte expressão matemática:

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{Eq. 5})$$

A diferença total de cor (TCD – *total colour difference*) é o parâmetro que traduz as variações da cor entre uma dada amostra, com coordenadas L^* , a^* e b^* e uma amostra referência, sendo calculado pela seguinte expressão matemática (equação 6). Os resultados podem ser classificados de acordo com a Tabela 2, atribuindo-lhes uma apreciação sensorial.

$$TCD = \sqrt{(L^* - L^*_0)^2 + (a^* - a^*_0)^2 + (b^* - b^*_0)^2} \quad (\text{Eq. 6})$$

Tabela 2 - Classificação do grau de diferenças pelo valor de TCD (Drlange 1994)

TCD	Grau de diferenças
0 - 0,2	Imperceptível
0,2 - 0,5	Muito pequena
0,5 - 1,5	Pequena
1,5 - 3	Distinta
3 - 6	Muito distinta
6 - 12	Grande
> 12	Muito grande

4.3.6 Determinação do comportamento reológico

O índice de consistência (k , Pa.sⁿ) das polpas foi calculado a partir dos valores da viscosidade aparente. A avaliação da viscosidade aparente das polpas (expressa em Pa.s) foi realizada utilizando um reômetro de tensão controlada (HAAKE MARS, Alemanha), equipado com geometria de pratos paralelos serrados com 35 mm de diâmetro, usando um intervalo entre placas de 1 mm. As curvas de viscosidade foram determinadas para uma gama de taxa de deformação de 0,1 a 100 s⁻¹. A taxa de deformação foi aplicada de forma crescente, em degraus consecutivos, com uma duração de 30 segundos, durante os quais se atingiu o estado estacionário e se mediu a viscosidade da amostra.

4.3.7 Determinação de Microrganismos Aeróbios a 30 °C

A determinação de microrganismos a 30 °C foi realizada de acordo com a normas EN ISO 21527-1 e ISO 4833-1, no laboratório de microbiologia da UTI do INIAV. Esta determinação baseia-se no princípio de que cada célula bacteriana presente numa amostra a analisar origina uma colónia individualizada e visível, após inoculação por incorporação e incubação a uma temperatura de 30 °C durante 72 horas em meio de cultura Plate Count Agar (PCA), utilizou-se solução de ringer para realizar as diluições, efetuaram-se 2 inoculações por amostra.

4.3.8 Análise Sensorial por painel de provadores

Segundo a NP 4263 (1994), define-se análise sensorial como um exame das características organoléticas de um produto, utilizando os órgãos dos sentidos, podendo incluir testes descritivos, discriminativos e/ou hedônicos.

Neste trabalho foi utilizado um painel constituído por 18 provadores selecionados e treinados de acordo com os critérios da ISO 8589 e ISO 8586-1. As análises foram realizadas nas instalações do INIAV-UTI, em cabines individuais com luz branca, à temperatura ambiente, de acordo com as recomendações da ISO 13299. As amostras de polpa foram servidas em copos de vidro, codificados com três dígitos, de forma aleatória.

O teste utilizado segundo o Método de Escala Hedônica, considerou a avaliação das seguintes características: Aparência, Cor, Consistência, Aroma/Sabor e Apreciação Global, com recurso a

uma escala de 5 pontos, onde o valor 1 representa o mínimo da apreciação correspondente a “desgostei muito”, 2 a “desgostei”, 3 a “não gostei nem desgostei”, 4 a “gostei” e 5 a “gostei muito”(Anexo A). Os resultados hedônicos foram submetidos à análise de variância e as médias submetidas ao teste de Tukey (95% de confiança), conforme se descreve na secção Descrição dos métodos estatísticos.

4.4 Descrição dos métodos estatísticos

O tratamento estatístico e gráficos foram elaborados nos programas Microsoft Excel 2010 e Statistica versão 8,0. No tratamento de resultados, para cada um dos parâmetros testados, foi realizada estatística descritiva, através da determinação da média, desvio padrão, erro e intervalo de confiança da média a 95%, por amostra. Para monitorizar os parâmetros analisados e a evolução das propriedades das amostras ao longo do tempo de armazenamento, foram efetuadas análises de variância a um factor (Teste de Tukey HSD para comparação de médias) e análise multivariada de componentes principais e de Cluster. A representação gráfica das variáveis que contribuem para a explicação das componentes principais e as coordenadas das amostras no plano formado pelas componentes principais (projeção das amostras no plano principal), permite reconhecer as correlações existentes entre variáveis originais e estabelecer grupos de amostras com comportamento semelhante, através de simples observação.

A análise fatorial (AF) refere-se a conjunto de técnicas relacionadas, para tornar os dados observados mais claros para a interpretação. Analisa-se os inter-relacionamentos entre as variáveis, de modo que estas possam ser descritas convenientemente por um grupo de categorias básicas, chamados fatores. Os fatores explicam a variância das variáveis observadas, tal como se revelam pelas correlações entre as variáveis que estão em análise (Vicini, 2005). Um dos principais métodos para a extração dos fatores é feito por meio da análise dos componentes principais. A análise de componentes principais (PCA) transforma um conjunto original de variáveis noutro conjunto: os componentes principais (CP) de dimensões equivalentes (Vicini, 2005). A componente principal é o arranjo que melhor representa a distribuição dos dados e a componente secundária é perpendicular á componente principal. Pretende-se com esta análise determinar as variáveis de maior influência na formação de cada componente.

5 Desenvolvimento de polpas de HF com adição de isolado proteico de soro

No âmbito do desenvolvimento de polpas de HF de elevada qualidade sensorial, nutricional / funcional, sensorial e com período de vida útil alargado, tivemos por objetivo otimizar uma formulação de HF, de tonalidade verde, com adição de proteínas provenientes de um isolado proteico obtido a partir de soro de leite (Figura 11).

Na definição da tecnologia do produto foram adotados princípios de conservação mínimos na ótica da tecnologia de barreiras, procurando igualmente responder às atuais tendências do consumidor (sem utilização aditivos químicos de síntese) e à diminuição do desperdício alimentar (valorização de subprodutos).

- Não utilizar conservação química (conservantes ou aditivos de síntese);
- Utilizar nas formulações, uma proporção de frutos que correspondem a excedentes de produção, no caso a maçã e a pera, como forma de promover a economia circular. Estes

frutos não requerem as exigências de calibre / conformação exigidas no mercado em fresco, mas retêm os mesmos padrões de qualidade nutricional / funcional.

- Selecionar HF, cujas características intrínsecas, permitam introduzir fatores de conservação no produto final, nomeadamente, a mistura de HF apresentar valor de $\text{pH} < 4,5$ (importante para o controlo do desenvolvimento microbiano) e, apresentar carácter antioxidante elevado (para prevenir oxidações enzimáticas);
- Otimizar tratamentos de estabilização térmica (pasteurização pelo calor) em função da qualidade sensorial, da inativação microbiana e enzimática.

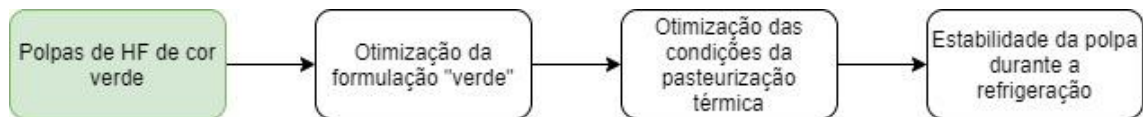


Figura 11- Apresentação sequencial dos estudos realizados neste trabalho.

5.1 Estudos de otimização da formulação

5.1.1 Objetivo

Com vista ao desenvolvimento de polpas de HF de tonalidade verde (Figura 12), foram testados *de per se* dois hortícolas: o espinafre e a salsa, em duas proporções (5 e 10%), em mistura com uma base constituída por maçã, pera e ananás.

A seleção da - salsa e espinafre, nas formulações baseou-se na trabalho D. I. Santos (2012) em que os mesmos foram apontados como possuindo na comparação com outros maior estabilidade do pigmento da clorofila.

Na seleção da formulação “verde” foram utilizados dois critérios obrigatórios: as misturas finais (polpas) apresentarem aceitação sensorial e estabilidade do pigmento verde.

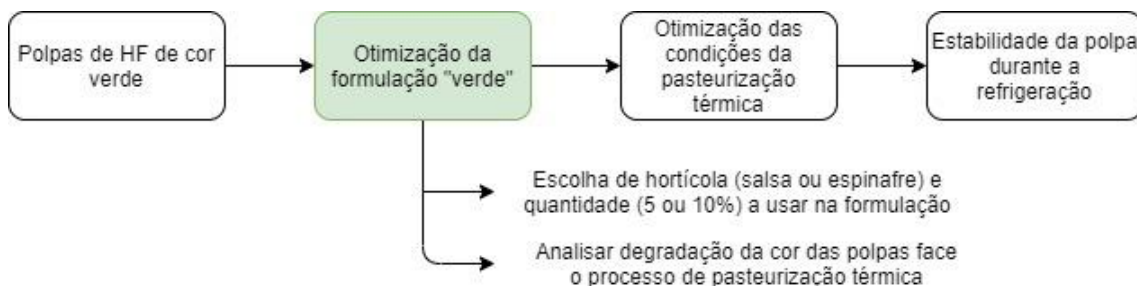


Figura 12- Apresentação sequencial dos estudos realizados neste trabalho.

5.1.2 Descrição da metodologia (ensaio 1 e 2)

Para selecionar a formulação “verde”, foram realizados 2 ensaios:

Ensaio 1

- Testar qual hortícola (salsa ou espinafre) e proporção (5 ou 10%) a utilizar na formulação e caracterizar individualmente as matérias-primas utilizadas nas formulações (maçã, pera, ananás, espinafre e salsa) face aos parâmetros (CFT, pH e TSS).

No primeiro ensaio foram preparados quatro tipos de formulações de polpas (*cf 1,2,1*) (Tabela 3), incluindo a mistura dos frutos (base): pera Rocha, maçã Fudgi e ananás, a que se adicionaram os hortícolas: espinafre ou salsa, em duas proporções, 5 e 10% (Id: E (espinafre); S (salsa)). Foi ainda preparada uma formulação sem adição dos referidos hortícolas (polpa controlo).

As polpas (1 kg) identificadas como: E5, E10, S5, S10 e controlo, foram distribuídas em caixas Petri (porções de 100 g) e mantidas à temperatura ambiente (Figura 13). Ao longo de 24 h foram estipulados intervalos de tempo nos quais foram avaliados parâmetros de cor CIELab e efetuados registos fotográficos. Foi efetuada a avaliação do TSS e pH e CFT nos HF, nas mesmas amostras e nos HF em natureza. Foi ainda realizada uma prova sensorial informal das polpas (E5, E10, S5 e S10).

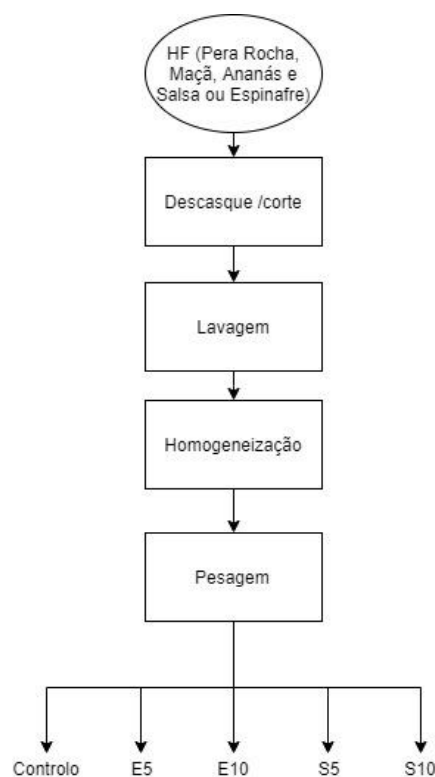


Figura 13- Preparação das amostras de polpas do Ensaio 1.

Tabela 3 – Proporção de mistura dos HF testados nas formulações do ensaio 1

<i>Formulação</i>	<i>Pera (%)</i>	<i>Maçã (%)</i>	<i>Ananás (%)</i>	<i>Salsa (%)</i>	<i>Espinafre (%)</i>
<i>Controlo</i>	56,25	18,75	25	0	0
<i>Polpa E5</i>	60	15	20	0	5
<i>Polpa E10</i>	55	15	20	0	10
<i>Polpa S5</i>	60	15	20	5	0
<i>Polpa S10</i>	55	15	20	10	0

Ensaio 2

- Com vista a conhecer o efeito da pasteurização térmica na qualidade (físico-química, microbiológica e sensorial) das polpas foi avaliado o efeito do tratamento térmico (90°C/10 min) na alteração das características da polpa em fresco, para as formulações que obtiveram maior estabilidade do pigmento verde. O binómio utilizado baseou-se em trabalhos anteriores (Silva 2012).

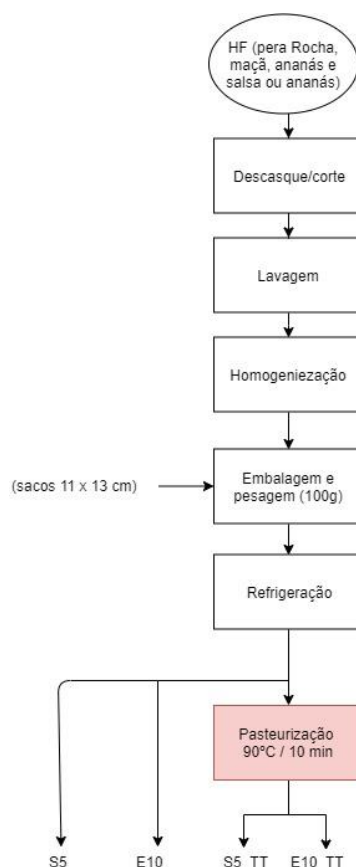


Figura 14- Preparação das amostras de polpas do Ensaio 2

No segundo ensaio foram preparados dois tipos de formulações (Tabela 3), incluindo a mistura dos frutos (base): pera Rocha, maçã e ananás, a que se acrescentou os hortícolas: espinafre (E10) ou salsa (S5), nas proporções de 5 e 10%, respetivamente. Após a homogeneização dos HF as polpas foram embaladas (100 g) em sacos termosoldados (dimensão 11 cm x 13 cm) seguindo-se a pasteurização térmica (90°C – 10 min) e o arrefecimento em banho de gelo (Figura 14). As amostras de polpa (E10 e S5, com (TT) e sem pasteurização) foram analisadas, em triplicado, face ao seguinte protocolo: cor CIELab, registos fotográficos, TSS, pH, atividade da PPO, CFT, viscosidade, avaliação sensorial e contagens de microrganismos aeróbios totais, no dia 0 e ao final de 24 h de armazenagem (5°C).

5.1.3 Resultados Ensaio 1

5.1.3.1 CFT, pH e TSS

Na Tabela 4, apresentam-se os resultados da avaliação do CFT de cada HF (espinafre, salsa, ananás, maçã e pera) e das formulações (E5, E10, S5 e S10, controlo).

Tabela 4 –Teor fenólico total (mg eq, ác gálico*100 g⁻¹) e valores de pH e TSS das amostras (valores médios± DP).

Amostra	CFT (mg eq. ác gálico*100 g ⁻¹)	pH	TSS (°Brix)
<i>Espinafre</i>	76,6 ± 1,68	6,1 ± 0,01	11,1 ± 0,5
<i>Salsa</i>	49,8 ± 0,89	6,3 ± 0,01	10,6 ± 0,5
<i>Ananás</i>	52,0 ± 0,85	3,6 ± 0,01	13,4 ± 0,5
<i>Maçã</i>	36,9 ± 0,21	4,1 ± 0,01	14,3 ± 0,5
<i>Pera</i>	37,2 ± 0,41	4,9 ± 0,01	11,9 ± 0,5
<i>Controlo</i>	13,2 ± 1,23	4,2 ± 0,01	13,1 ± 0,5
<i>E5</i>	34,2 ± 0,23	4,3 ± 0,01	13,0 ± 0,5
<i>E10</i>	42,1 ± 0,07	4,2 ± 0,01	12,3 ± 0,5
<i>S5</i>	29,3 ± 0,08	4,3 ± 0,01	12,8 ± 0,5
<i>S10</i>	36,1 ± 1,79	4,3 ± 0,01	11,0 ± 0,5

Da comparação do CFT da formulação controlo com as formulações E10 e S5 verifica-se que a introdução de ambos os hortícolas, provocou acréscimos, de mais de dobro, na composição fenólica, dependendo das proporções utilizadas (5 ou 10%). A introdução destes na mistura base para além de conferir a tonalidade verde revelaram-se importantes para a elevação da capacidade antioxidante / funcional da polpa.

Todas as formulações testadas apresentaram valores de pH inferiores a 4,5, importante como se referiu para a estabilidade microbiana do produto. No entanto, a introdução dos hortícolas levou a uma ligeira elevação do valor de pH (acrécimo de 0,1 unidade).

O TSS das misturas com hortícolas em comparação com o da mistura base, manteve-se sem alterações importantes quando a proporção utilizada foi de 5%. No entanto, quando a proporção na mistura foi de 10% verificou-se uma diminuição do teor de sólidos solúveis, justificada pelo facto de nestes hortícolas o teor de açúcares ser muito inferior ao dos frutos. A tendência de diminuição foi de cerca de 1°Brix e de 2°Brix, para o espinafre e salsa, respetivamente. Valores inferiores a 12°Brix poderão ser indesejáveis na ótica da aceitação sensorial das polpas no que respeita à perceção da doçura.

5.1.3.2 Cor e registos fotográficos

Nas figuras 15 e 16, são apresentadas, respetivamente, as evoluções dos valores médios para os parâmetros de cor: tonalidade h^a e índice de escurecimento (WI), das amostras E5, E10, S5, S10 e na formulação base (controlo), como forma de avaliar a estabilidade da cor verde das polpas (à temperatura ambiente) na dependência do hortícola e da proporção, na mistura.

A introdução dos hortícolas (salsa e espinafre) nas formulações, independentemente da proporção (5 e 10%), alterou de forma acentuada, a tonalidade da polpa controlo (ananás, maçã e pera) de amarelo (valores angulares h^a de cerca de 100) para valores na gama da tonalidade verde, 116 a 120.

Quando se compara a evolução da tonalidade nas polpas ‘verdes’ com o controlo, verifica-se que (independentemente dos valores iniciais) a introdução dos dois hortícolas confere estabilidade à tonalidade das misturas. De facto, na amostra controlo verifica-se uma descida acentuada ao longo dos primeiros 60 minutos (de amarelo para castanho) que se atribui à oxidação enzimática (enzimas polifenoloxidasas). Neste sentido a introdução dos hortícolas revelou-se benéfica para a estabilidade oxidativa das polpas.

Durante a primeira hora, as formulações verdes apresentaram estabilidade da tonalidade verde (ligeiras variações de h^a) independentemente do tipo de hortícola (E, S) e respetiva proporção (5 e 10 %). No intervalo de tempo (60 até 200 min) para as amostras S5, S10 e E10 verificaram-se menores variações de h^a face à amostra E5 (maior estabilidade). No restante período ($t > 600$ min) manteve-se a mesma tendência com exceção da amostra S10 que acompanhou a tendência de descida da amostra E5.

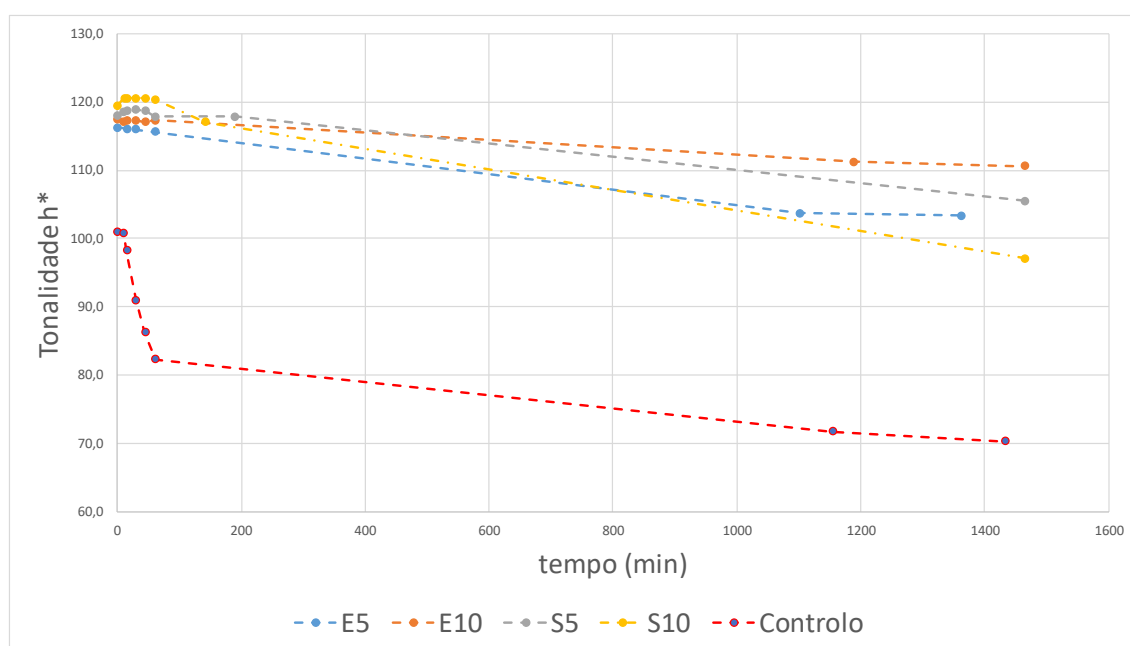


Figura 15 - Valores médios da tonalidade h^a das amostras E5, E10, S5, S10 e na formulação base (controlo), avaliados ao longo do tempo (à temperatura ambiente).

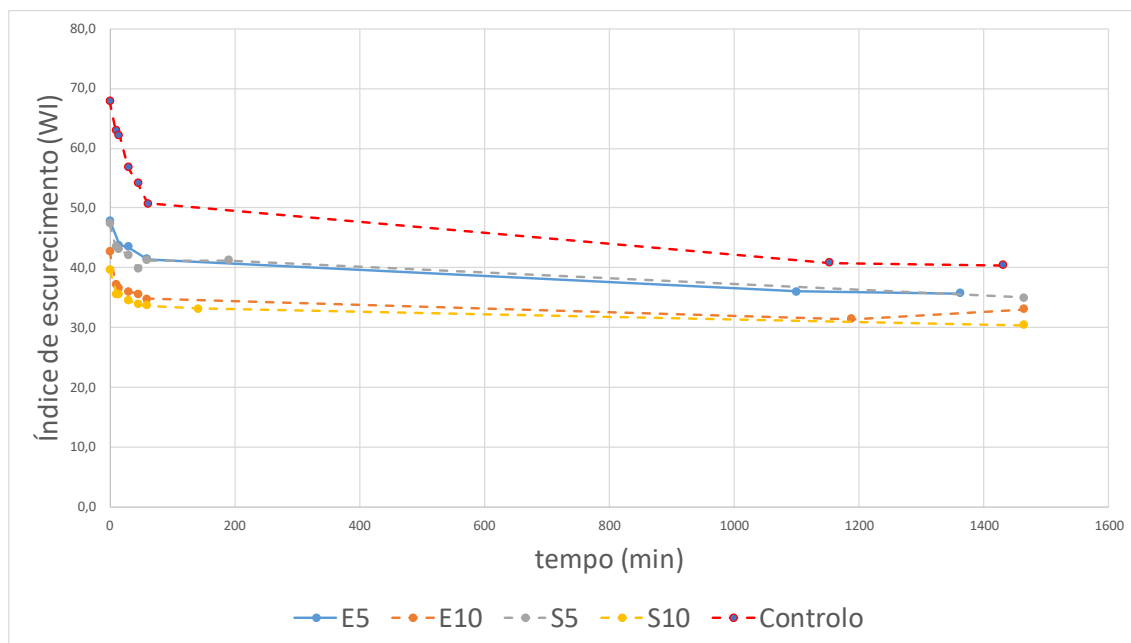












Figura 16 - Valores médios do índice de escurecimento WI das amostras E5, E10, S5, S10 e na formulação base (controlo), avaliados ao longo do tempo (à temperatura ambiente).

A evolução do índice WI (em que a diminuição dos valores traduz o aumento de escurecimento) revela, para todas as amostras, o aumento do escurecimento ao longo do tempo, caracterizada por uma taxa inicial de escurecimento rápido (até ca de 60 min) com posterior tendência para a estabilização dos valores. Por outro lado, verifica-se que a taxa de escurecimento inicial foi superior na amostra de polpa base (0,3 WI/h) em comparação, com as polpas cujas formulações incluíram os hortícolas (salsa e espinafre) (0,1 WI/h). Este facto demonstra a importância da introdução dos mesmos para a estabilização oxidativa da mistura. Este facto pode ser justificado pela capacidade antioxidante elevada dos dois hortícolas, avaliada indiretamente pelos teores fenólicos totais (tabela 5), com valores de 50 e 77 mg eq, ác gálico*100 g⁻¹, para a salsa e espinafre, respetivamente. Estes valores comprovam os resultados observados no registo fotográfico (Tabela 5).

Tabela 5- Registo fotográfico das amostras de Controlo, E5, E10, S5 e S10, após fabrico e ao final de 3 dias à temperatura ambiente (21°C).

<i>Amostra</i>	<i>Dia 0</i>	<i>Dia 3</i>
<i>E5</i>		
<i>E10</i>		
<i>Controlo</i>		
<i>S5</i>		
<i>S10</i>		

5.1.3.3 Prova sensorial informal

Nesta fase do trabalho, a prova das diferentes formulações de polpa (E5, E10, S5 e S10) realizou-se de forma informal (10 provadores), através da qual foi pedida uma apreciação global (avaliação dos atributos: sabor/aroma, cor e consistência). As formulações E10 e S5, receberam uma aceitação global muito favorável (>4,5), sobretudo atribuído aos atributos cor da polpa e aroma. Salienta-se que nenhum dos provadores conseguiu identificar os dois hortícolas na mistura pensando tratar-se apenas de uma polpa de frutos.

Pela apreciação sensorial e pela estabilidade da tonalidade verde as formulações **E10 e S5**, foram selecionadas para prosseguir os estudos de otimização.

5.1.4 Resultados Ensaio 2

5.1.4.1 pH e TSS

Da tabela 7, verifica-se que os valores de pH, de todas as amostras de polpa, situam-se abaixo de 4,5, independentemente da aplicação ou ausência de pasteurização. Assim, todas as situações cumpriram o critério de conservação inicialmente estabelecido ($\text{pH} < 4,5$) importante para a prevenção do desenvolvimento microbiológico durante a armazenagem.

Os valores de TSS (Tabela 6), situaram-se, para todas as amostras, na ordem de 10 a 11°Brix. Estes valores também não foram influenciados pela aplicação do tratamento térmico, mas revelaram-se inferiores aos obtidos no ensaio 1. Este facto, atribui-se à diferença acentuada no valor de TSS do ananás, utilizado nos dois ensaios (14,0 vs 10,7, ensaio 1 e 2 respetivamente). De qualquer forma as misturas finais (E10 e S5, com e sem pasteurização) manifestaram níveis de doçura aceitáveis do ponto de vista sensorial (prova informal).

Tabela 6 – Valores médios (\pm DP) de pH e TSS (°Brix) das polpas E10 e S5 com (TT) e sem tratamento térmico de pasteurização.

<i>Amostras</i>	<i>pH</i>	<i>TSS</i>
<i>E10</i>	4,0 \pm 0,01	10,5 \pm 0,5
<i>E10_TT</i>	4,2 \pm 0,01	10,8 \pm 0,5
<i>S5</i>	4,2 \pm 0,01	11,0 \pm 0,5
<i>S5_TT</i>	4,2 \pm 0,01	10,0 \pm 0,5

5.1.4.2 Cor CIELab e registos fotográficos

Os resultados médios dos parâmetros de cor CIELab (C^* , Hue e WI) analisados nas amostras E10 e S5, com e sem pasteurização, são apresentados na tabela 7.

Verificou-se que a pasteurização tem um efeito significativo na alteração da tonalidade (h°) de ambas as polpas, com diminuição dos respetivos valores angulares. Esta variação traduz-se visualmente na perceção da tonalidade verde intenso para verde acastanhado após pasteurização (Tabela 7). Sob efeito da pasteurização, o parâmetro croma, apenas para a amostra E10 (cor mais pura), segue a mesma tendência de diminuição. Os níveis de escurecimento (WI), não manifestaram alterações sob influência do tratamento térmico.

Para ambas as polpas a análise dos diferentes parâmetros da cor CIELab, após fabrico versus ao final de 24 h de armazenagem (5°C), revelaram valores semelhantes, traduzindo a desejada tendência de estabilidade da cor verde.

Tabela 7 – Variação dos parâmetros de cor nas amostras de E10 e S5 com e sem tratamento térmico (90 °C/10 min)

<i>Amostra</i>	<i>Momento de análise</i>	<i>Croma (C*)</i>	<i>Tonalidade (h*)</i>	<i>WI</i>
<i>E10</i>	Após fabrico	26,0±0,5	117,5±0,4	33,2±0,5
<i>E10</i>	24 h (5°C)	22,3±0,2	117,2±0,1	32,2±0,3
<i>E10_TT</i>	Após fabrico	20,8±0,4	102,0±0,3	33,2±0,2
<i>E10_TT</i>	24 h (5°C)	21,2±0,2	101,7±0,3	32,9±0,4
<i>S5</i>	Após fabrico	19,8±0,6	114,6±0,4	35,7±0,8
<i>S5</i>	24 h (5°C)	15,6±0,7	106,2±0,2	33,1±0,7
<i>S5_TT</i>	Após fabrico	19,8±0,1	102,9±0,7	38,7±0,4
<i>S5_TT</i>	24 h (5°C)	17,2±0,4	96,5±0,8	35,8±0,7

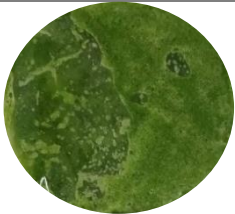
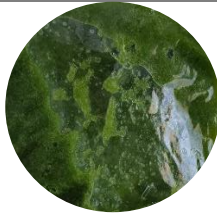

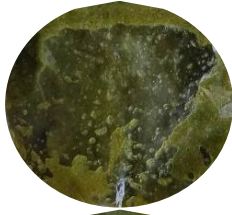




Na tabela 8, apresentam-se os registos fotográficos das amostras E10 e S5 (com e sem pasteurização) tiradas após processamento e ao final de 24 h de armazenagem (5°C).

Para ambas as polpas (E10 e S5) verificou-se uma alteração significativa da cor verde após a pasteurização (90°C/10 min). Passou da tonalidade verde ‘relva’ para uma tonalidade de verde seco, com ‘fundo’ mais acastanhado. No entanto, estas cores não são percebidas como desagradáveis, principalmente se não forem colocadas em comparação no momento da avaliação sensorial.

O sabor e aroma foram identificados como muito agradáveis para ambas as formulações. A formulação S5 conserva mais o aroma do que a E10. No entanto, a E10 denotou ainda que de forma muito ligeira sabor a ‘cozido’.

Sensorialmente, estas polpas foram classificadas com sabor pouco doce relativamente às do ensaio anterior devido, como referido, ao TSS do ananás utilizado ser inferior.

Tabela 8 – Registo fotográfico das amostras de E10 e S5 com e sem tratamento térmico, após fabrico e ao final de 24h armazenagem (5°C),

<i>Amostras</i>	<i>Após fabrico</i>	<i>Após 1 dia armazenagem (5°C)</i>
<i>E10</i>		
<i>E10_TT</i>		
<i>S5</i>		
<i>S5_TT</i>		

5.1.4.3 Conteúdo Fenólico Total

Os resultados de CFT avaliados nas formulações E10 e S5, com e sem pasteurização são apresentados na figura 17. Desta, verifica-se que polpa com espinafre (E10) apresentou valores de CFT na ordem de 50-52 mg eq. ácido gálico.100 g⁻¹, significativamente superiores ($p < 0,05$) aos obtidos nas amostras de polpa S5, com valores na ordem 37-38 mg eq. ácido gálico.100 g⁻¹, (acréscimo de ca 25 %). Este facto pode ser justificado pela proporção de espinafre (10%) introduzida corresponder ao dobro da concentração introduzida em salsa (5%). Por outro lado, não se verificou efeito da pasteurização no teor de CFT para ambas as formulações (E10 e S5), não tendo os valores apresentado diferenças estatisticamente significativas entre si.

No estudo de Soutinho, S. (2012) foram avaliados, em condições de extração similares, teores de CFT para diferentes frutos vermelhos (framboesa, groselha e mirtilo) de 47, 64 e 73 mg eq. ácido gálico.100 g⁻¹, respetivamente. Noutros estudos foi avaliado para a fruta fisalis valores de CFT de 58 mg eq. ácido gálico.100 g⁻¹ (Rockenbach et al., 2008) e, de 15 a 91 mg eq. ácido gálico.100 g⁻¹ (Wu et al., 2006).

Os níveis de CFT avaliados nas polpas (E10 e S5) apresentam-se próximos da gama de valores anteriormente referidos sendo que a comparação é feita com os chamados pequenos frutos que se caracterizam pela elevada capacidade antioxidante e riqueza fenólica.

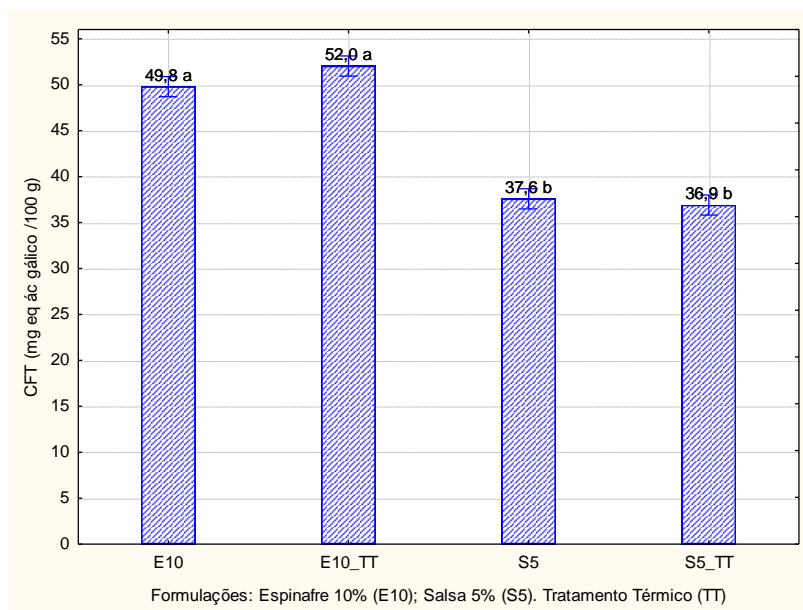


Figura 17 – Teor de fenólico total (CFT) das amostras E10 e S5 com e sem tratamento térmico. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey). Barras verticais correspondem a 95% confiança.

5.1.4.4 *Peroxidase*

A partir da avaliação da atividade enzimática da peroxidase (PPO) nas amostras E10 e S5 (com e sem pasteurização) foram calculados os níveis percentuais de inativação enzimática e os níveis de atividade residual, alcançados com a aplicação da pasteurização (90°C/10 min), que se apresentam na tabela 9. Verificou-se, para ambas as polpas um nível de inativação da PPO de cerca de 90%, situação que é indicada para garantir a estabilidade enzimática durante a armazenagem em condições de refrigeração (Zanatta *et al.*, 2006).

Tabela 9 – Atividade da POD nas amostras de E10 e S5 com e sem tratamento térmico (90 °C/10 min).

Amostras	PPO (un.100g ⁻¹)	Ativ. residual POD (%)	% de Inativação POD
S5	29,1		
S5_TT	1,9	6,6	93,4
E10	26,4		
E10_TT	3,0	11,3	88,7

5.1.4.5 Microbiologia

As contagens microbiológicas (Mic. 30°C) obtidas para ambas as polpas (com e sem pasteurização), apresentam-se na figura 18. A contaminação inicial das polpas sem tratamento, situa-se na ordem de 5 ciclos Log UFC.g⁻¹. A ordem de grandeza da contaminação avaliada é concordante com a referida para produtos hortofrutícolas, podendo incluir uma grande diversidade de microrganismos na gama de 10⁵ a 10⁷ UFC.g⁻¹ dependente do tipo de HF (Hagenmaier *et al*, 1998).

As polpas pasteurizadas (90°C/ 10 min) registaram uma redução de 2 ciclos logarítmicos para a amostra E10 e de 3 ciclos para a S5. A contaminação após tratamento, na ordem de 2 ciclos, é considerada aceitável para este tipo de produtos quando se pensa conservá-los em condições de refrigeração (utilizando como critério limite valores <4 ciclos log).

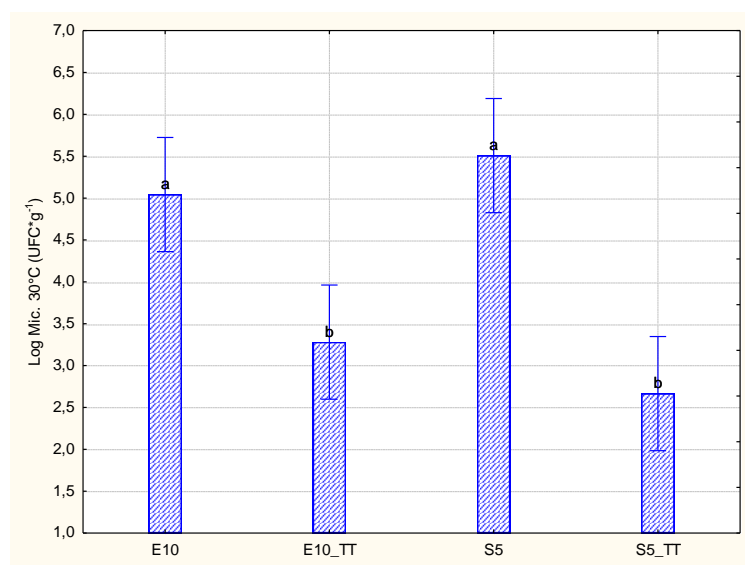


Figura 18- Contagens de microrganismos a 30 °C (Log (UFC/g) avaliados nas amostras E10 e S5 com e sem tratamento térmico. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey). Barras verticais correspondem a 95% confiança.

5.1.4.6 Análise Sensorial

Para ambas as polpas (E10 e S5) verificou-se uma alteração significativa da cor verde após a pasteurização (90°C/10 min). Houve uma alteração de tonalidade para tons mais amarelos acastanhados. No entanto estas cores não são percebidas como desagradáveis, principalmente se não forem colocadas em comparação. O sabor e aroma apreciados foram muito agradáveis, para ambas as formulações (resultados médios da apreciação global >4). A S5 conserva mais o aroma que a E10, tendo nesta amostra sido notado um ligeiro sabor a 'cozido'.

Os resultados da avaliação sensorial deram preferência à formulação S5 (média 4,5 para a apreciação global vs 4 para a formulação E10), tendo a mesma sido selecionada para prosseguir os estudos.

5.1.4.7 Viscosidade

Com vista a avaliar o efeito da pasteurização e da introdução de isolado proteico no comportamento reológico do produto da polpa S5, foi realizado um ensaio - delineamento fatorial completo (2x2) cujas variáveis independentes foram: a pasteurização (90°C/10 min) e a introdução de isolado proteico (82,3%). Para o efeito foram constituídas 4 amostras em duplicado identificadas conforme se descreve: S5 (formulação não pasteurizada), S5_TT (formulação pasteurizada); S5+IP (formulação com introdução isolado proteico), S5+IP_TT (formulação com introdução isolado proteico pasteurizada).

Os resultados traduziram todas as amostras um comportamento não newtoniano reofluidificante, sendo discutidos os parâmetros k (índice de consistência) e n (índice de escoamento) a partir da linearização das curvas taxa de escoamento em função de viscosidade aparente (lei de potência). Pela comparação das amostras sem tratamento térmico (Figura 19) conclui-se que a introdução do isolado proteico (IP) não teve influência ($p < 0,05$) na consistência da polpa S5. No entanto, após tratamento térmico a polpa S5 com introdução de IP (S5+IP) demonstrou valores de consistência ($p < 0,05$) superiores (de dobro).

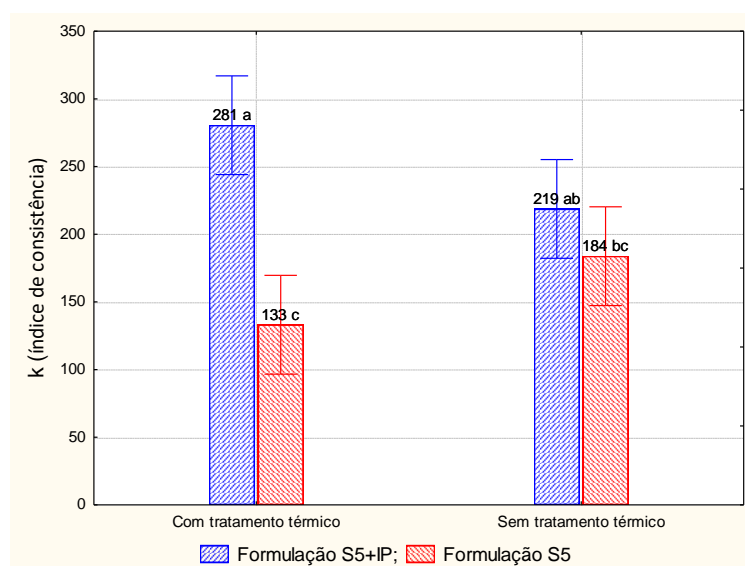


Figura 19- Efeitos da aplicação de tratamento térmico (90°C/10 min) e da introdução de isolado proteico (IP) no índice de consistência (k) da formulação S5. Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$). Barras verticais correspondem a 95% confiança

Os valores médios de consistência das polpas, com e sem isolado proteico (S5+IP e S5) não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) com valores de 281 e 219, respetivamente. Após pasteurização a consistência das polpas (S5+IP e S5) também não verificou diferenças significativas (133 e 184, respetivamente). No entanto, a pasteurização exerceu um efeito significativo na diminuição da consistência da polpa com isolado proteico. Este facto poderá ser atribuído à desnaturação da proteína na sequência do tratamento térmico.

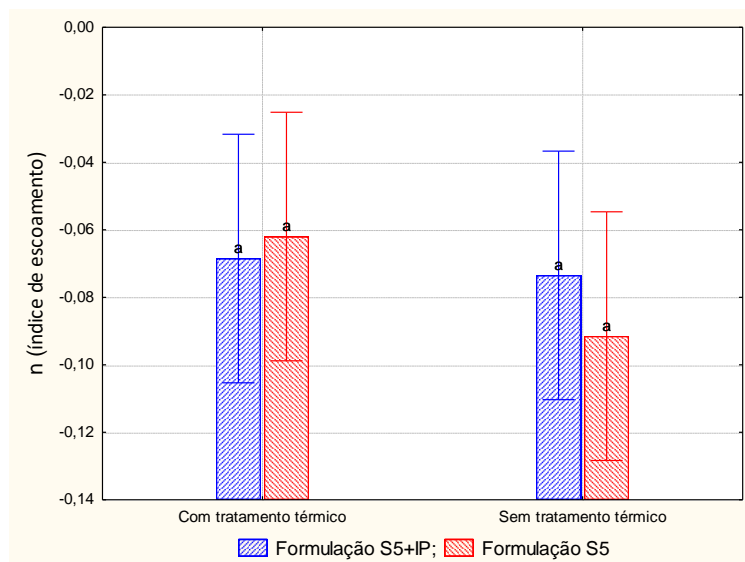


Figura 20- Efeitos da aplicação de tratamento térmico (90°C/10 min) e da introdução de isolado proteico (IP) no índice de escoamento (n) da formulação S5. Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).

Verificou-se (figura 20), a ausência de efeitos significativos ($p < 0,05$) do tratamento térmico e da introdução de IP, no índice de escoamento (n) que caracteriza o afastamento ao comportamento Newtoniano.

5.1.5 Conclusão parcial

As polpas de cor verde – formulações E10 e S5 apresentaram valores de pH $< 4,5$, cumprindo um dos critérios de conservação inicialmente estabelecidos. Os valores de TSS, situaram-se na gama de 10 a 14 °Brix e esta variação mostrou uma grande dependência do TSS do ananás (muito distinta nos dois ensaios).

Os resultados preliminares da avaliação dos efeitos da pasteurização (binómio (90°C/10 min)) na qualidade das polpas E10 e S5 foram:

- Verificou-se, a redução da contaminação inicial da polpa (grupo de Mic. 30 °C), situando-se após pasteurização, na ordem de 3 ciclos Log (UFC.g⁻¹).
- Foi alcançado um nível de inibição da POD de cerca de 90%, situação indicada para garantir a estabilidade enzimática durante a armazenagem em condições de refrigeração.
- O CFT inicial das polpas não foi alterado após pasteurização apresentando a formulação E10 valores mais elevados (acréscimo de ca 25 %) face à S5.

- Foi constatada uma alteração visível da cor das polpas passando de verde 'relva' para verde amarelo acastanhado. A avaliação sensorial classifica ambas as polpas com níveis de aceitação tendo, no entanto, a polpa S5 obtido aceitação global superior, facto atribuído principalmente à componente aromática presente na salsa.
- Os valores médios de consistência da polpa S5 não foram significativamente alterados nem sob efeito da introdução de isolado proteico nem sob efeito da pasteurização.
- A polpa S5 foi a formulação selecionada para prosseguir os estudos.

5.2 Estudo das condições de pasteurização térmica

5.2.1 Objetivo

De modo a caracterizar os efeitos da pasteurização térmica na alteração da cor, na inibição da enzima peroxidase (POD), na composição fenólica e na atividade microbiana, foram testados diferentes binómios temperatura / tempo (Figura 21).

Para a seleção do tratamento térmico foram utilizados os seguintes critérios: estabilidade enzimática (inibição da atividade da peroxidase superior a 90%), diminuição significativa da microbiota de contaminação vegetativa, maximização da composição fenólica e aceitação sensorial do produto após tratamento.

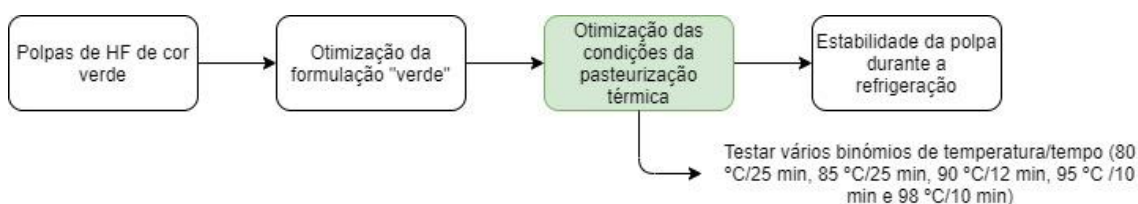


Figura 21 – Indicação da fase de estudo.

5.2.2 Descrição da metodologia

Neste ensaio foi preparado apenas a formulação S5 (Tabela 3), incluindo a mistura dos frutos (base): pera Rocha, maçã e ananás, a que se acrescentou o hortícola: salsa (S5), na proporção de 5%. Após a homogeneização dos HF as amostras de polpa foram embaladas (100 g) em sacos termosoldados (dimensão 11 cm x 13 cm) seguindo-se a pasteurização térmica a diferentes temperaturas e tempos (tabela 10) e o arrefecimento em banho de gelo (Figura 22). As amostras (S5 com e sem tratamento) foram analisadas, em triplicado, face ao seguinte protocolo: cor CIELab, TSS, pH, atividade da POD e CFT.

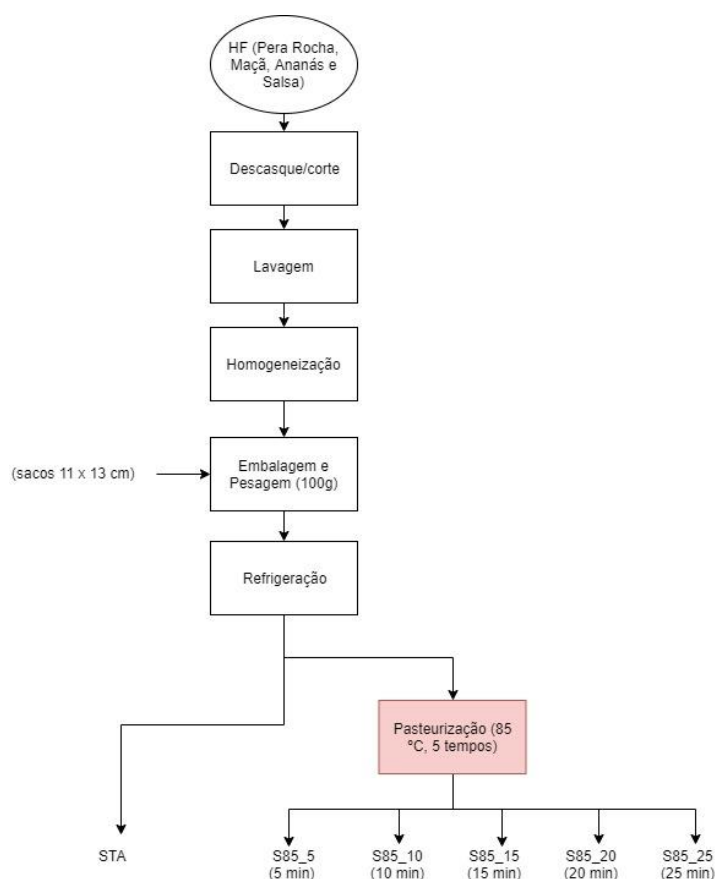


Figura 22- Diagrama do ensaio de pasteurização

Tabela 10 –Binómios temperatura/tempo testados na pasteurização

Temperatura (°C)	Tempos (min)
80	5, 10, 15, 20 e 25
85	5, 10, 15, 20 e 25
90	4, 6, 8, 10 e 12
95	2, 4, 6, 8 e 10
98	2, 4, 6, 8 e 10

5.2.3 Resultados

5.2.3.1 Valores de CFT, pH e TSS

Para cada valor de temperatura testada, os valores médios de pH, TSS e CFT não verificaram diferenças significativas na dependência do tempo (dados não apresentados). As comparações dos valores médios de pH, TSS e CFT, entre os 5 valores de temperaturas testadas

(independentemente dos tempos de tratamento) face à condição em fresco (ausência de pasteurização; amostra controlo) encontra-se, respetivamente, nas figuras 23, 24 e 25.

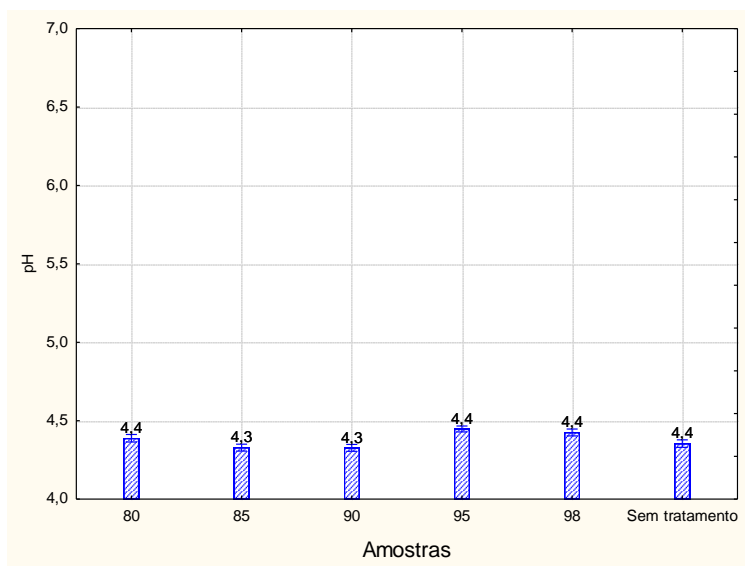


Figura 23 – Valores de pH das amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização (independentemente do tempo de pasteurização). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).

A variação máxima para os resultados de pH entre amostras tratadas às diferentes condições de temperatura e amostra controlo, não excedeu 0,1 unidade, mostrando que a pasteurização não afetou este parâmetro.

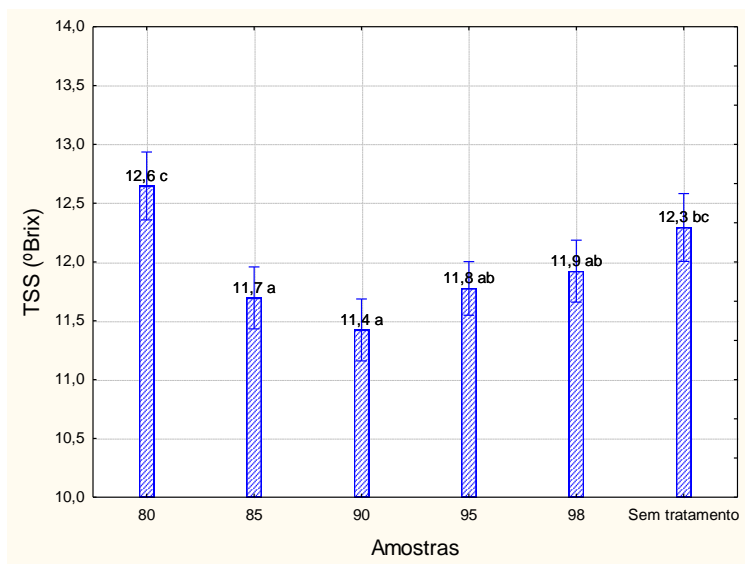


Figura 24 – Valores de TSS das amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização (independentemente do tempo de pasteurização). Barras verticais correspondem a 95% de confiança. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey).

Verificou-se uma diminuição do TSS ($p<0.05$) entre a amostra controlo e as condições de pasteurização para os valores de temperatura de 85°C e de 90°C, na ordem de 1,2°Brix. No

entanto, não se verifica uma tendência entre a variação de TSS e os valores de temperatura, podendo a mesma ser atribuída às diferenças nas matérias-primas que deram origem às amostras S5 utilizadas no ensaio.

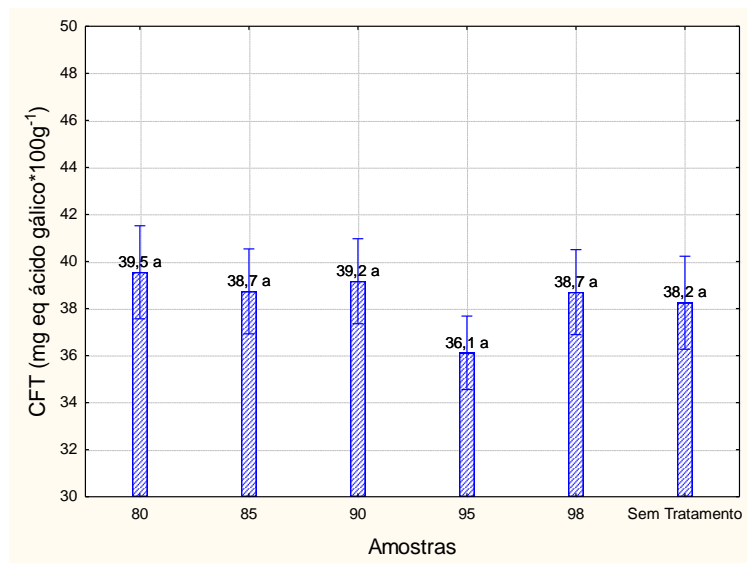


Figura 25 – CFT de amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização (independentemente do tempo de pasteurização). Barras verticais correspondem a 95% de confiança. Valores médios com letras iguais não apresentam diferenças significativas a 0,95 (teste Tukey).

O CFT avaliado na amostra controlo não sofreu alterações face a todas as condições de pasteurização testadas, apresentando todas as amostras valores similares, na gama de 36,1 a 39,5 mg de eq. ácido gálico*100g⁻¹.

5.2.3.2 Parâmetros de Cor – tonalidade e croma

Os resultados da tonalidade (h^*) avaliados nas amostras S5 submetidas às diferentes condições de pasteurização (binómios T/t) foram ajustados ao modelo cinético de 1º ordem (*Arrhenius*) (Equação 7), tendo apresentado ajuste aceitável face aos coeficientes de correlação obtidos de $R=0,94$; $R^2=0,88$ (Figura 26). A partir do modelo, os parâmetros cinéticos obtidos (energia de ativação (E_a), constante de reação (C_0) à temperatura de referência ($k_{90\text{ °C}}$)), encontram-se na tabela 11.

$$C = C_0 \exp \left(-k_{ref} \exp \left(\frac{-E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}} \right) \right) t \right) \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que: C é o fator em estudo (h^*), C_0 é o valor do fator (h^*) para T=temperatura de referência (363,15 K / 90°C), K é a taxa de degradação do fator, E_a , energia de ativação, R é a constante de gases perfeitos e T, a temperatura absoluta (Kelvin).

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos para a alteração da tonalidade (h^*) nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura e tempo de pasteurização.

Parâmetros cinéticos	Estimativa
C_0	111,99
K_{ref} (363, 15°K) (min^{-1})	0,020
E_a (kJ.mol^{-1})	5,6740

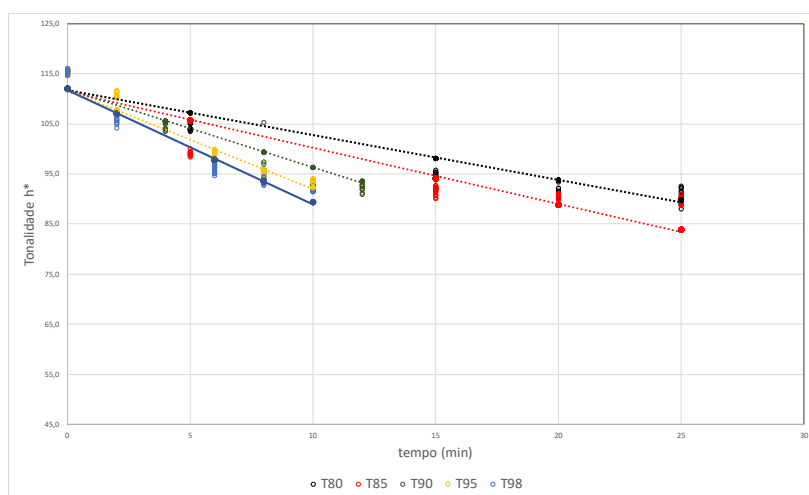


Figura 26 – Alteração da tonalidade (h^*) nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização.

Face ao modelo (Figura 26) verifica-se que a alteração da tonalidade da polpa S5, no sentido da diminuição dos valores (h^*) (tal como observada anteriormente cf 5.1.4.2) é tanto mais acentuada quanto maior for o valor da temperatura de pasteurização.

Num estudo similar Noa, A. (2012), noutro tipo de polpa (formulação amarela: pera + ananás) obteve um valor de $E_a=56,1 \text{ kJ.mol}^{-1}$ (modelo *Arrhenius*) face à variação do parâmetro h^* em diferentes condições de pasteurização. Este valor é superior, em cerca de 10 vezes face ao obtido com a polpa S5 (E_a de $5,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$). Esta relação traduz que a tonalidade da polpa verde é mais suscetível à degradação sob efeito do tratamento térmico face à polpa amarela.

Os resultados da cromaticidade (C^*) avaliados nas amostras S5 submetidas às diferentes condições de pasteurização (binómios T/t) não foram ajustados pelo modelo cinético de *Arrhenius* (Figura 27) impossibilitando estabelecer uma relação deste parâmetro nas diferentes condições de pasteurização.

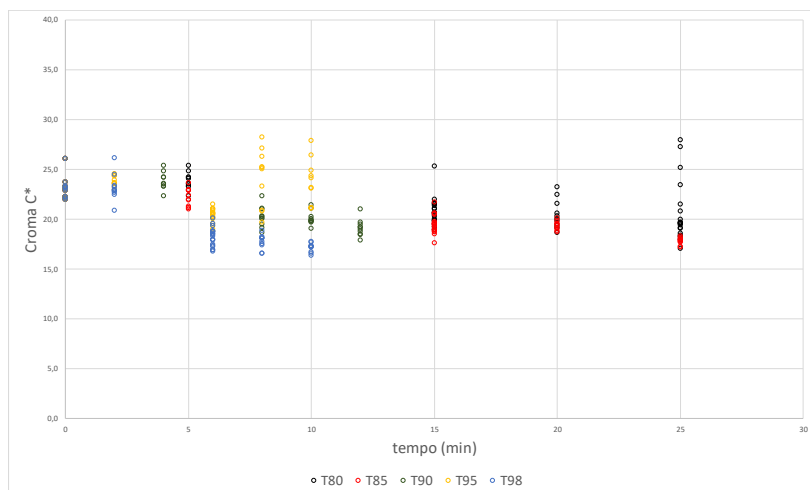


Figura 27 – Alteração da cromaticidade (C^*) das amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura e tempo de pasteurização.

5.2.3.3 Peroxidase

Os resultados de inativação da POD (%) avaliados nas amostras S5 submetidas às diferentes condições de pasteurização (binômios T/t) foram ajustados ao modelo cinético de 1ª ordem, tendo apresentado coeficientes de correlação de $R = 0,99$; $R^2 = 97,80$ (Figura 28). A partir do modelo, os parâmetros cinéticos de energia de ativação (E_a), constante de reação (C_0) à temperatura de referência ($k_{90} \text{ } ^\circ\text{C}$) encontram-se na tabela 12.

Tabela 12– Parâmetros cinéticos para a inativação da POD (%) nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura e tempo de pasteurização.

Parâmetros cinéticos	Estimativa
C_0	101,88
$K_{ref} (358,15 \text{ } ^\circ\text{K}) (\text{min}^{-1})$	0,35
$E_a (\text{kJ.mol}^{-1})$	116,44

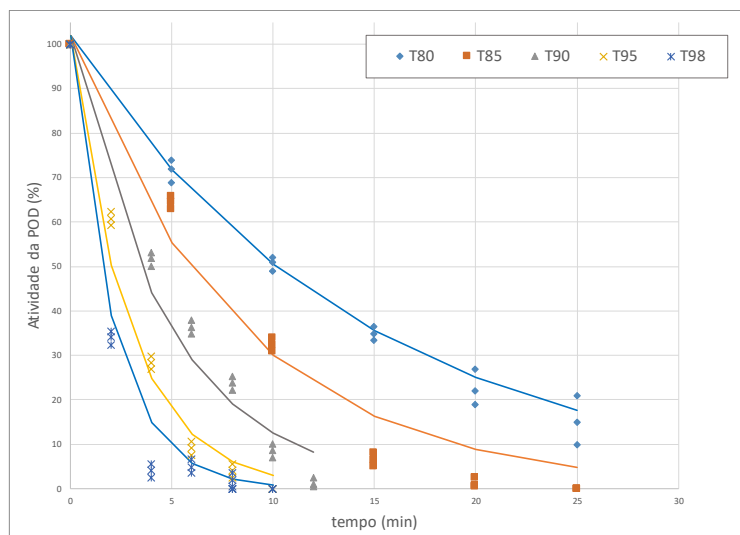


Figura 28 – Valores de POD (%) avaliado nas amostras S5 submetidas a diferentes valores de temperatura de pasteurização.

Face ao modelo (Figura 28), verifica-se que a inativação da POD na polpa S5, é tanto maior quanto maior for o valor da temperatura de pasteurização. O valor da $E_a = 116,44 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ($27,8112 \text{ kcal/mol}$) está dentro da gama de 12 a 100 kcal/mol reportada para o processo de inativação térmica de enzimas termorresistentes (Luiz, RC *et al*, 2007).

Num estudo similar Noa, A. (2012), noutros tipos de polpa (formulação amarela: pera + ananás e formulação vermelha: pera + beterraba + morango + limão) obtiveram para a inativação da POD (modelo *Arrhenius*) valores de E_a de $68,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$ e de $52,9 \text{ kJ.mol}^{-1}$, respetivamente. Estes valores correspondem a cerca de metade do valor de E_a obtido para a polpa verde, traduzindo a maior resistência térmica da POD para a polpa em estudo.

5.2.4 Conclusão parcial

Foi possível concluir que o efeito das diferentes condições de pasteurização (todos os binómios T/t testados) exerceram uma influência marginal na alteração dos parâmetros de pH, TSS e CFT, atendendo às variações máximas avaliadas de 0,1 unidade, de $1,2^\circ\text{Brix}$ e de $3,4 \text{ mg}$ de eq. ácido gálico $\cdot 100\text{g}^{-1}$, respetivamente.

Na gama de condições de pasteurização testadas foi possível ajustar os resultados da tonalidade (h^*) e da inativação da PPO (POD %) a modelos cinéticos (1ª ordem) em que a variação dos parâmetros cinéticos de degradação em função da temperatura obedeceu à relação de Arrhenius.

Os parâmetros cinéticos obtidos (E_a , K_{ref} e C_0) para a alteração da tonalidade foram: $C_0=111,9$; $K=0,02$ e $E_a=5,7 \text{ kJ.mol}^{-1}$, e para a inativação da POD foram: $C_0=101,9$; $K=0,35$ e $E_a=116,4 \text{ kJ.mol}^{-1}$.

A energia de ativação (E_a) obtida para o fenómeno de inativação da POD foi cerca de 20 vezes superior ao obtido para a alteração da tonalidade (h^*) traduzindo uma maior dificuldade no fenómeno de inativação térmica da POD relativamente à alteração da cor da polpa.

5.3 Estudo da estabilidade da formulação otimizada, com e sem introdução de proteínas de soro, em condições de refrigeração (5°C)

5.3.1 Objetivo

Com o objetivo de avaliar os efeitos do armazenamento em refrigeração (5°C) na qualidade físico-química, microbiológica e sensorial da formulação de polpa verde selecionada (S5), com e sem a adição de isolado proteico (*ca* de 0,66%), submetidas à condição de pasteurização otimizada (90°C/10 minutos). Foi efetuado um estudo da estabilidade das polpas S5 e S5+IP, durante a armazenagem (30 dias) para estimar o respetivo período de vida útil (Figura 29).

Os parâmetros de qualidade em avaliados incluíram: atributos microbiológicos (contagens de Mic. a 30°C e de Bolores e Leveduras; Log UFC.g⁻¹), atributos físico-químicos (pH, TSS (%), atividade da POD (%), teor de compostos fenólicos totais (CFT)) e avaliação sensorial por painel (cor e sabor/aroma).

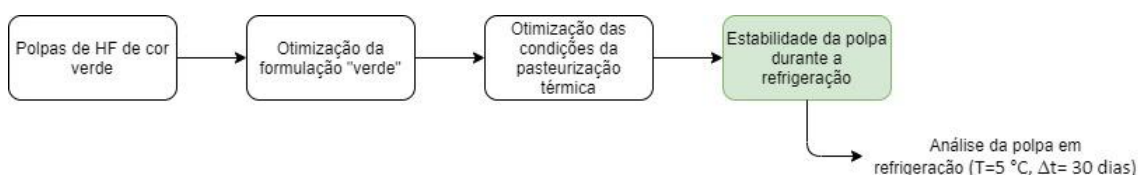


Figura 29 - Indicação da fase de estudo.

5.3.2 Descrição da metodologia

Na realização deste ensaio foram constituídas dos tipos amostras (formulação S5) com e sem introdução de isolado proteico (S5 e S5+IP). As amostras (triplicados) foram pasteurizadas (90°C/10 minutos) após embalagem (sacos com 100 g cada) e armazenadas em condições de refrigeração (5°C ± 1°C). As amostras de polpa foram analisadas face ao seguinte protocolo: cor CIELab, registos fotográficos, TSS, pH, atividade da PPO, CFT e contagens de Mic. 30°C, no dia de processamento (dia 0) e nos dias 2, 6, 13, 20 e 30 de armazenamento.

5.3.3 Resultados

5.3.3.1 Valores de pH e TSS

Os valores médios de TSS e pH avaliados nas amostras S5 e S5+IP ao longo do período da armazenagem, encontram-se representados nas figuras 30 e 31, respetivamente.

A comparação de médias entre amostras e dias de armazenamento, não verificou diferenças significativas, com duas exceções: no dia 13 (em que o TSS da amostra S5 foi superior ao da amostra S5+IP, 12,4 vs 11,8) e nas amostras S5+IP entre o dia 0 e o dia 30 de armazenagem. No entanto, a variação máxima avaliada não excedeu o valor de 0,6 °Brix. Neste sentido e para ambas as amostras, a variação do TSS pode considerar-se estável ao longo da armazenagem.

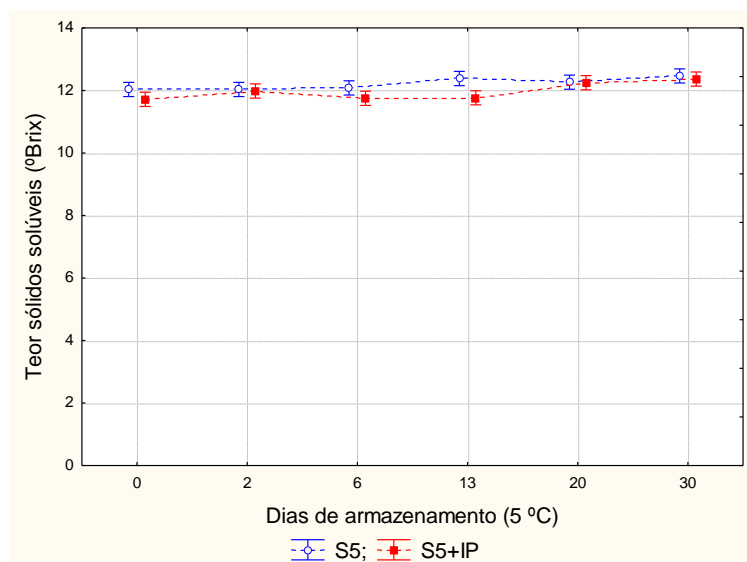


Figura 30 – Valores médios do TSS avaliados nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).

Os resultados da avaliação do pH, mostram que a adição de proteína (polpa S5+IP) produziu um incremento, estatisticamente significativo, (0,1-0,2 unidades ao longo de todo o período de armazenagem) face às amostras S5. Verificou-se também, para ambas as polpas, aumentos ($p<0.05$) ao longo do tempo de armazenagem (0,3 unidades) do 6º para o 13º dia.

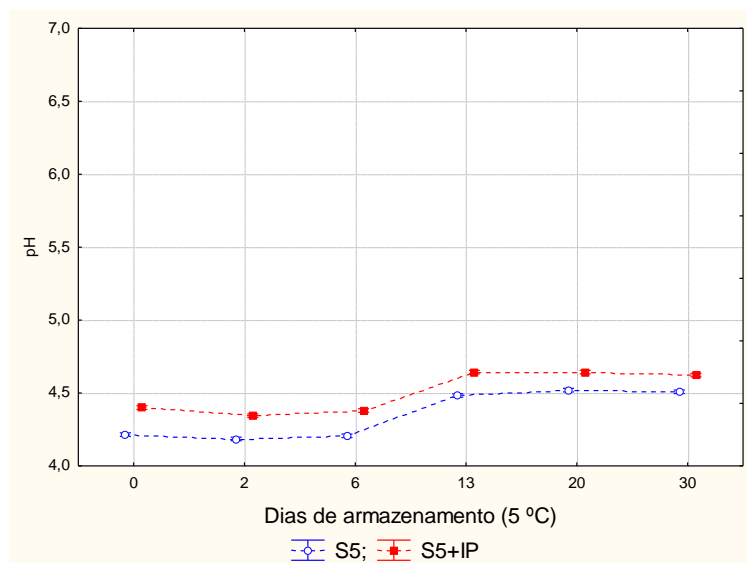


Figura 31 - Valores médios do pH nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).

A ligeira tendência de alcalinização, verificada ao longo da armazenagem (variação máxima de 0,3 unidades de pH), apenas tem impactos na polpa S5+IP na medida em que, a partir do 13º dia) se supera, ainda de que de forma ligeira, o critico estabelecido ($pH < 4,5$), importante para o controlo do desenvolvimento microbiano.

5.3.3.2 Compostos Fenólicos Totais

A comparação de médias de CFT avaliados nas amostras S5 e S5+IP ao longo do período da armazenagem, encontram-se representados na figura 32.

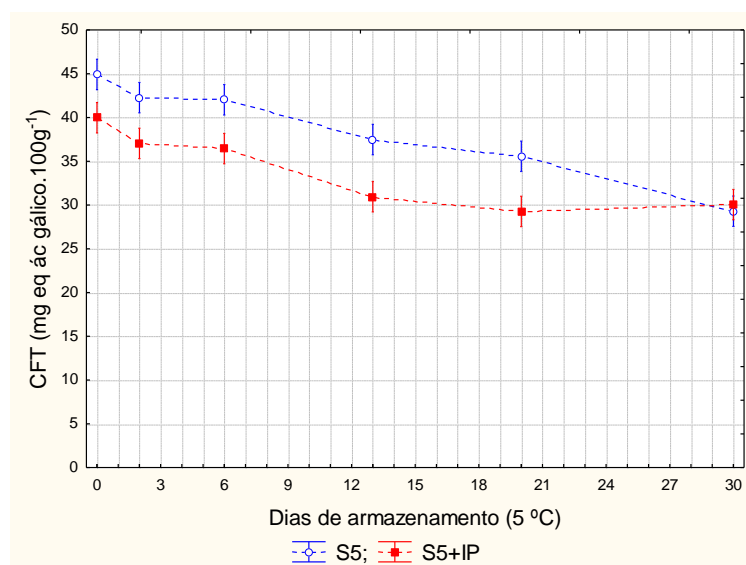


Figura 32- Evolução do CFT nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).




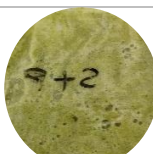

Logo após processamento (dia 0) a polpa com adição de isolado proteico (S5+IP) apresentou um CFT médio significativamente inferior à polpa S5 (40,0 vs 44,9 mg eq. ácido gálico*100 g⁻¹). Este facto, poderá ser justificado pela interação das proteínas com os compostos fenólicos dos HF resultando, em consequência, numa maior dificuldade na sua extração fenólica.

Verificou-se, para ambas as amostras, uma tendência de diminuição do teor fenólico ao longo da armazenagem. Na polpa S5, essa tendência revelou-se significativa, no primeiro, terceiro e último, intervalos testados. Na polpa S5+IP, a diminuição foi significativa apenas no terceiro intervalo testado, mantendo constantes os teores até ao 30º dia. Faz-se notar que no final do período de armazenagem ambas as polpas apresentaram CFT similares (29 e 30 mg eq. ácido gálico*100 g⁻¹) para as polpas S5 e S5+IP, respetivamente. A diminuição do conteúdo fenólico durante o armazenamento em refrigeração é normalmente atribuída ao aumento da degradação enzimática destes compostos, nomeadamente quando ocorre ativação do sistema enzimático, incluindo as enzimas antocianases, polifenoloxidase e peroxidase (Galani et al., 2017).

5.3.3.3 Cor CIELab e registos fotográficos

Através dos registos fotográficos (Tabela 15) e dos parâmetros de Cor CIELab (WI, h*, C* e TCD) apresentados nas figuras 33, 34, 35 e 36, respetivamente, foi possível caracterizar a evolução da cor polpas ao longo do armazenamento em refrigeração (5°C).

Tabela 13 – Evolução dos registos fotográficos nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).

	Dia 0	Dia 2	Dia 6	Dia 13	Dia 20	Dia 30
S5						
S5+IP						

Apesar da polpa S5 apresentar níveis de superiores à polpa S5+IP (Tabela 13), é possível observar, nos dois tipos de amostras, uma tendência de escurecimento ao longo da armazenagem semelhante entre ambas (Figura 33). O escurecimento é atribuído a oxidações enzimáticas dos compostos fenólicos.

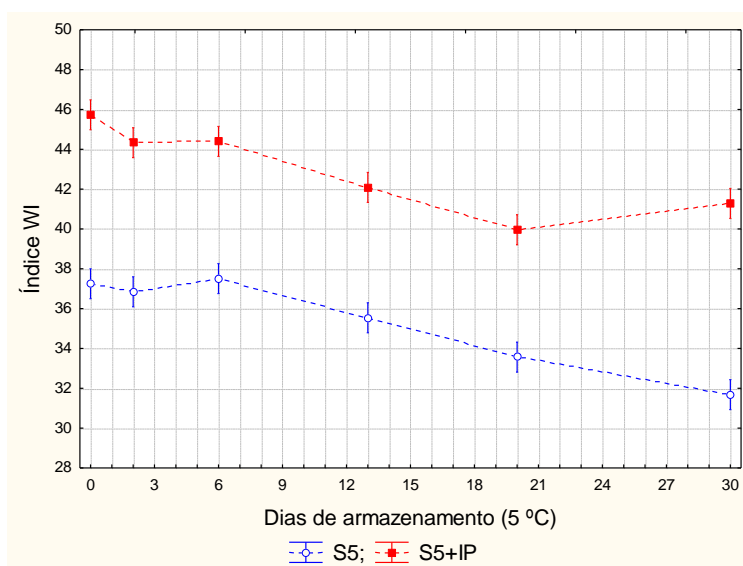


Figura 33 - Evolução do índice de escurecimento (WI) nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).

A evolução da tonalidade (h^*) e da cromaticidade (c^*) nos dois tipos de amostras (S5, S5+IP), refletem, respetivamente a alteração da cor verde para tons mais acastanhados (diminuição dos valores h^*) e o aumento da sujidade da cor (diminuição dos valores c^*). No entanto, as respetivas taxas de degradação foram semelhantes sendo a diferença entre amostras atribuída às diferenças obtidas nos valores iniciais (tempo 0).

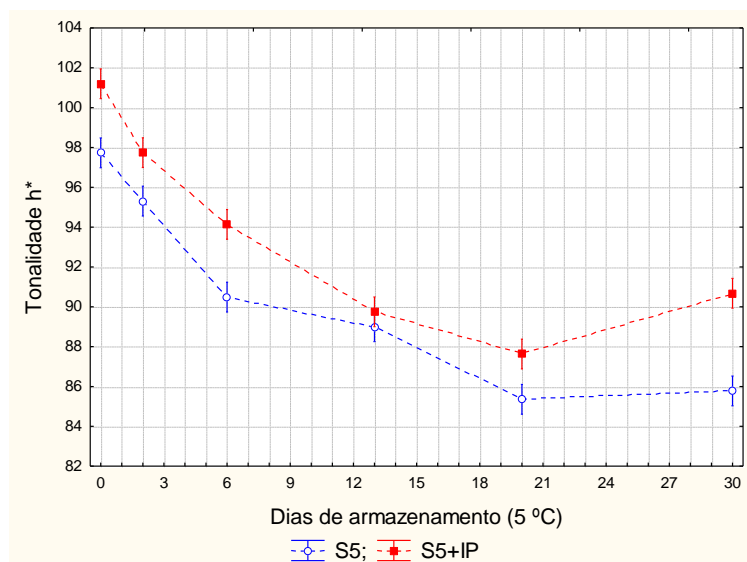


Figura 34 - Evolução da tonalidade h^* nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).

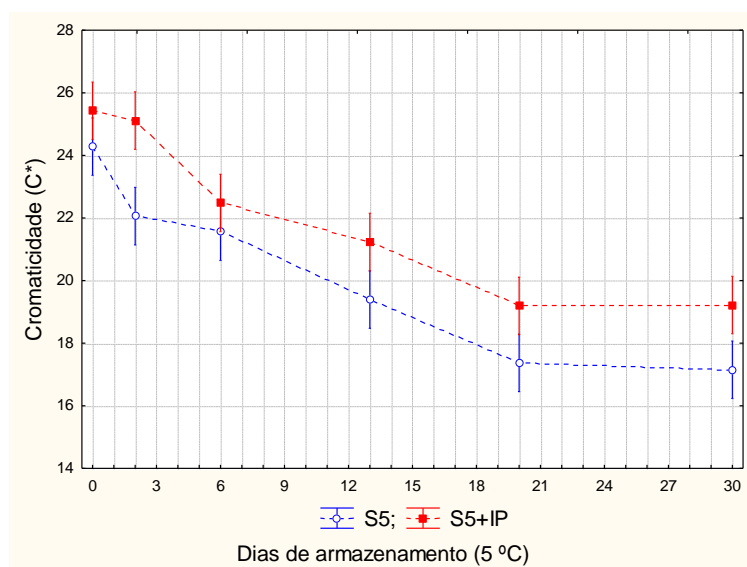


Figura 35 - Evolução cromaticidade nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).

De acordo com a classificação de Drlange 1994 (Tabela 2) e com a evolução das diferenças totais de cor TCD apresentadas nos dois tipos de polpas (S5 e S5+IP) (Figura 36), verifica-se uma alteração mais rápida na cor da polpa com isolado proteico (S5+IP) em comparação com a polpa S5. Neste sentido, a polpa S5+IP, logo ao sexto dia integra o intervalo (3 a 6) revelando diferenças muito distintas face à condição inicial (tempo 0). Até ao 6º dia, a polpa S5 pertence ao intervalo (1.5 a 3) em que as diferenças são classificadas como distintas. A partir do 13º dia a polpa S5+IP está no intervalo de classificação das diferenças acentuadas, o que só acontece a partir do dia 20 para a polpa S5. No dia 30 ambas as polpas integram o mesmo intervalo (6 a 12) em que as diferenças de cor são classificadas como muito acentuadas.

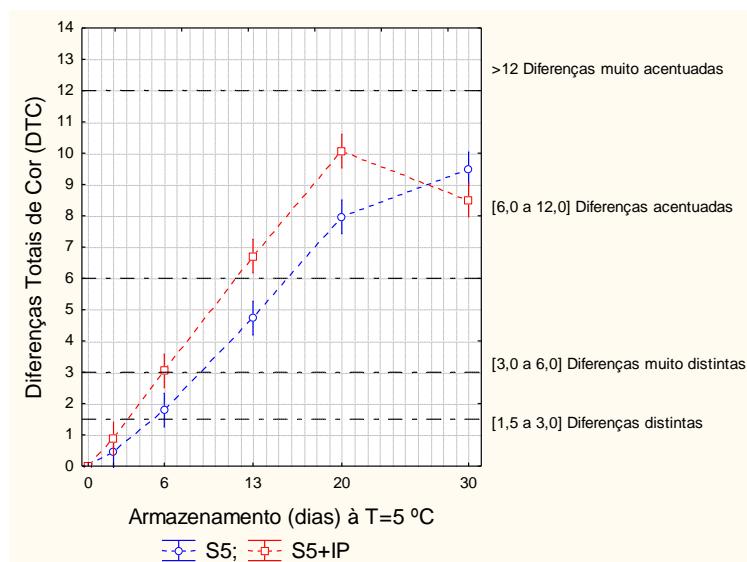


Figura 36 - Evolução das diferenças totais da cor (TCD) nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).

5.3.3.4 Peroxidase

De acordo com a figura 37, verifica-se que houve regeneração da atividade da POD durante a armazenagem. Até ao 13º dia a atividade enzimática manteve-se, para ambas as polpas, próximo de 0. No entanto, ao final do 30º dia, as polpas S5 e S5+IP, contabilizaram valores de atividade da POD de cerca de 10,3 e 0,5 unidade/g⁻¹, respetivamente.

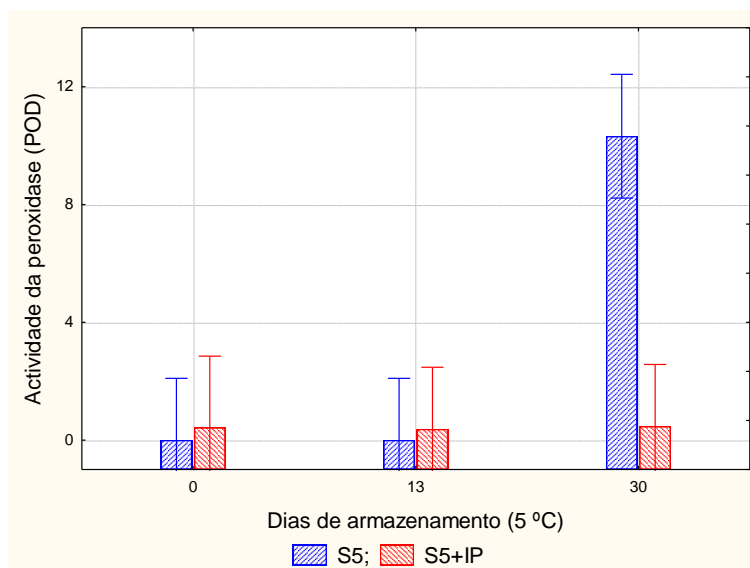


Figura 37 - Atividade residual da POD nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey (p=0.05).

5.3.3.5 Microbiologia

Na figura 38 (a e b), apresentam as contagens médias (Log UFC.g⁻¹) para os grupos de mesófilos (Mic. 30 °C) e de Bolores e leveduras, avaliadas nas amostras S5 e S5+IP ao longo da armazenagem refrigerada.

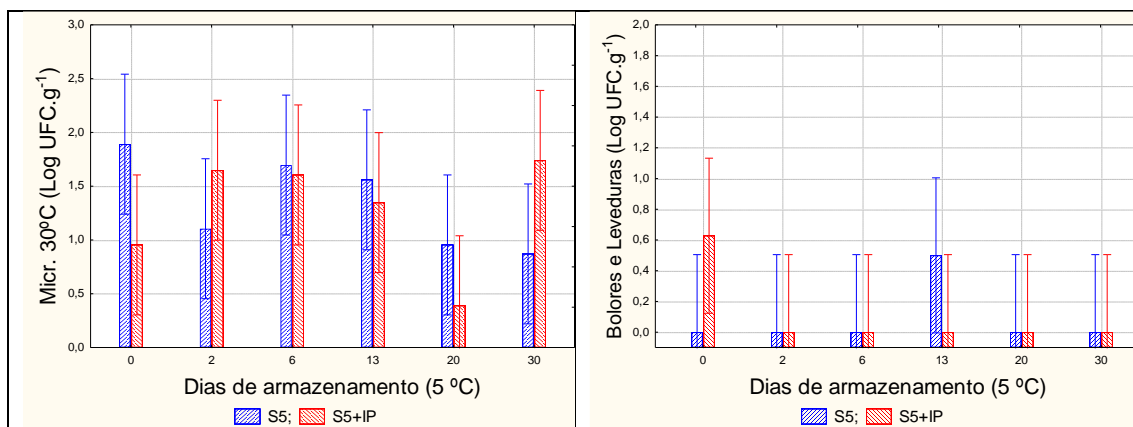
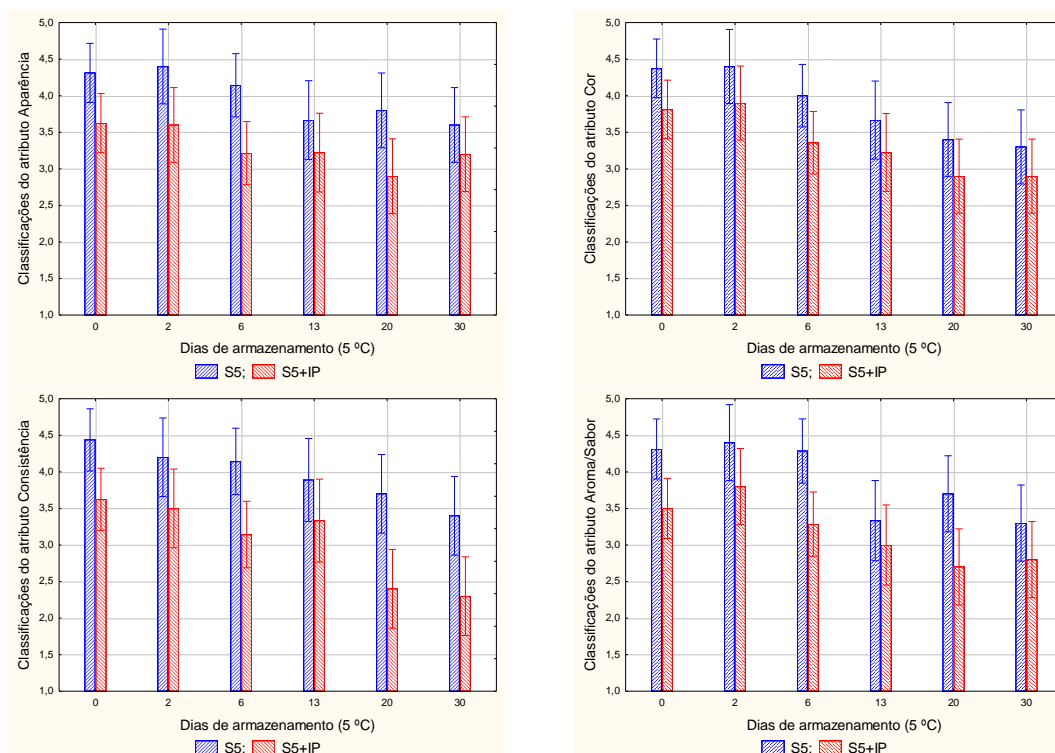


Figura 38 (a e b) - Evolução das contagens Microbiológicas (Mic. 30°C; ciclos Log (UFC.g⁻¹)) nas amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).

As contagens microbiológicas, para ambos os grupos microbiológicos testados, não sofreram variações significativas ao longo do período total testado. A manutenção das respetivas contagens, inferior a 2 ciclos Log para os Mic. 30 °C e, inferior a 1 ciclo Log para o grupo de bolores e leveduras, caracteriza uma situação de estabilidade face à contaminação inicial (t=0) e, em consequência, a ausência de desenvolvimento microbiano significativo durante 30 dias de armazenagem.

5.3.3.6 Análise Sensorial

Foi realizada uma análise sensorial para caracterizar a evolução dos atributos sensoriais: aparência, cor, consistência e aroma/sabor, assim como a apreciação global da polpa, ao longo dos 30 dias (5 °C) (Anexo B). As classificações médias de todos os atributos sensoriais em avaliação diminuem ao longo do período de armazenagem traduzindo o afastamento à condição inicial (t=0) (Figura 39).



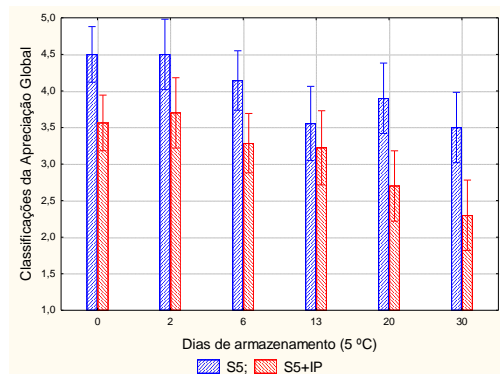


Figura 39 – Classificações sensoriais para os atributos (aparência, cor, consistência, aroma/sabor, e apreciação global) atribuídas às amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C). Barras verticais correspondem a 95% de confiança, teste Tukey ($p=0.05$).

Por outro lado, observa-se que as classificações atribuídas às amostras S5 foram sempre superiores relativamente às amostras S5+IP. Para os atributos consistência, aroma / sabor e apreciação global essa comparação revelou-se em muitos dias significativa ($p<0,05$).

Uma forma de quantificar a avaliação sensorial é através da sua aceitabilidade (Equação 8) com vista a prever o comportamento do produto no mercado (Moscatto *et al.*, 2004). Segundo Teixeira *et al.* (1987) e Dutcosky (2007), para que o produto seja considerado aceite sensorialmente é necessário que este obtenha um Índice de Aceitabilidade (IA) de no mínimo, 70%. Na tabela 14 apresenta-se para os dois tipos de polpa o índice de aceitabilidade nas diferentes datas analisadas.

$$IA (\%) = A \times 100/B \quad \text{Eq. (8)}$$

(A = nota média obtida para o produto; B = nota máxima dada ao produto)

Tabela 14 – Evolução dos Índice de aceitabilidade das amostras S5 e S5+IP ao longo de 30 dias de armazenagem (5°C).

Dia	Amostra	Índice aceitabilidade (%)
0	S5	90
2	S5	90
6	S5	83
13	S5	71
20	S5	78
30	S5	70
0	S5+IP	71
2	S5+IP	74
6	S5+IP	66
13	S5+IP	64
20	S5+IP	54
30	S5+IP	46

Com base no cálculo do IA, pode-se concluir que a polpa S5 apresentou boa aceitabilidade ao longo dos 30 dias (IA superior $\geq 70\%$) enquanto que na polpa S5+IP essa condição só foi observada até ao 2º dia de armazenagem. Este facto atribui-se principalmente à depreciação da

consistência e à perda de aroma, que a partir do 20º dia obtiveram classificações inferiores a 3 (entre as âncoras 2 a “desgostei” e 3 a “não gostei nem desgostei”).

5.3.3.7 Análise exploratória multivariada

Análise Hierárquica por Agrupamentos (cluster)

O conjunto de resultados de caracterização das amostras S5 e S5+IP durante 30 dias de armazenagem, foram submetidos a uma análise de cluster com o objetivo de agrupar as amostras homogêneas em função dos parâmetros avaliados.

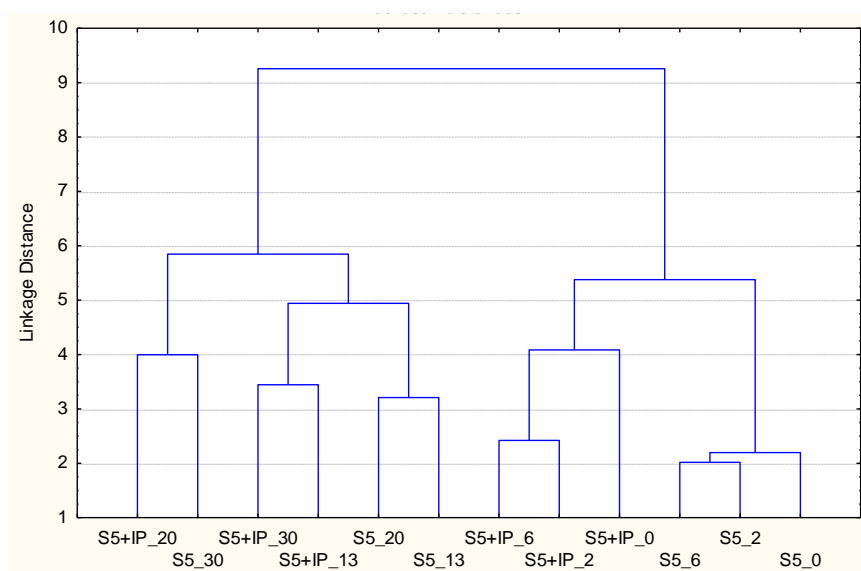


Figura 40 – Dendrograma das amostras (S5 e S5+IP)

O dendrograma da figura 40 representa a árvore hierárquica das amostras de polpa (S5 e S5+IP), agregados de acordo com o *Complete-Linkage Method*, tendo como critério os parâmetros avaliados. A interpretação do dendrograma é feita pela distância euclidiana (*linkage distance*), considerando, neste caso, que quanto maior for a distância que separa as classes, mais distintas são as amostras. Admitindo um corte na distância euclidiana de 6, é possível ordenar as amostras, em dois grupos. No grupo mais à esquerda agrupam-se as amostras dos dois tipos de polpas nas fases finais da armazenagem (dias 13, 20 e 30) e, no segundo grupo, os mesmos tipos de amostras nas fases iniciais de armazenagem (dias 0, 2 e 6).

Análise de fatores e análise por componentes principais (PCA)

Os dados de caracterização das amostras foram submetidos a uma análise fatorial com o objetivo de agrupar as variáveis em componentes principais. Os resultados obtidos para os coeficientes dos fatores, e, para os componentes principais, respectivos eigenvalues e percentagens da variância total explicada são apresentados nas tabelas 15 e 16, respetivamente.

Da tabela 16, verifica-se que as duas primeiras principais componentes (PC1, PC2) justificam 79,56 % da variabilidade total. O PC1 explica uma proporção de 56,6 % e é composto pelas variáveis: pH, TCD, CFT, Cromo (C*), Tonalidade (h*), e todos os atributos avaliados por painel sensorial (aparência, cor, consistência, aroma/sabor e apreciação global). As variáveis pH, TCD com coeficientes positivos e as restantes com coeficientes negativos. O PC2 explica 22,9% da variabilidade total e é composto apenas pela variável: WI (índice de escurecimento) com coeficiente positivo.

Nas figuras 41 e 42, apresentam-se as projeções espaciais dos vetores das variáveis e das amostras (S5, S5+IP) no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

Tabela 15 – Coeficientes das variáveis para os fatores 1 e 2 (variáveis significativas assinaladas a vermelho).

Variáveis	Fator 1	Fator 2
TSS	0,4850	-0,6917
pH	0,9244	0,1915
CFT	-0,9670	-0,0786
Croma	-0,7384	0,6189
Hue 360°	-0,7239	0,5901
WI	-0,1176	0,9792
TCD	0,9416	-0,3114
Micro. 30°	-0,4919	0,1659
Bolores e Leveduras	-0,1658	0,2995
Aparência	-0,8270	-0,5285
Cor	-0,9613	-0,2103
Consistência	-0,8504	-0,4202
Aroma / Sabor	-0,9004	-0,3905
Apreciação Global	-0,8491	-0,4628
POD	0,6025	-0,3900

Tabela 16 - Componentes principais, respetivos eigenvalues e percentagens da variância total explicada por cada um dos componentes.

Componentes principais	Eigenvalue	% Total - variância	Cumulativo - %
PC1	8,49	56,6	56,598
PC2	3,44	22,96	79,561

Analisando os gráficos da projeção espacial das amostras e da projeção espacial dos vetores das variáveis, podemos tentar inferir uma interpretação para as componentes principais. Assim, da projeção das amostras no plano definido pelas duas componentes principais (PC1, PC2) (Figura 41) evidencia-se uma separação em dois grupos (de acordo com a análise de cluster), que reflete, para o PC1, o efeito da armazenagem na alteração dos parâmetros de qualidade avaliados, independentemente do tipo de amostra. Em termos de período de armazenagem a separação dos dois grupos distingue o período inicial de armazenagem até ao 6 dia do final do dia 13 até ao dia 30.

Relativamente ao PC1 (Figura 42), verificamos que a variável TCD (diferenças totais de cor) apresenta uma relação inversa com as variáveis h^* e C^* , bem como, face aos atributos sensoriais da cor por avaliação sensorial. Esta dependência demonstra a concordância das avaliações, objetiva (parâmetros CIELab) e sensorial (painel de provadores). Neste sentido, o aumento das TCD correspondem à diminuição de h^* e C^* (alteração da tonalidade e croma) e à diminuição das classificações sensoriais. Esta situação acontece para as amostras (S5 e S5+IP) nos períodos finais de armazenagem (13, 20 e 30 dias) (Figura 36) e traduz o efeito da armazenagem.

Por outro lado, todas as variáveis da avaliação sensorial (classificações da cor, aparência, consistência, aroma e apreciação global) com projeção negativa na PC1 demonstram a depreciação sensorial das amostras durante o período de armazenagem. Da mesma forma, as variáveis pH (com projeção positiva na PC1) e CFT (com projeção negativa na PC1) traduzem a evolução destes parâmetros (aumento e diminuição, respetivamente) ao longo da armazenagem, independentemente do tipo de amostra.

Da figura 41, observa-se que a projeção das amostras S5+IP se localizam no 1º e 4º quadrantes e as amostras S5 no 2º e 3º quadrante. Tendo em conta que a PC2 (Figura 42), depende apenas da projeção positiva da variável WI (índice de escurecimento) conclui-se que a mesma se refere ao nível de escurecimento (independentemente da tonalidade) apresentado, independentemente do tipo de amostras.

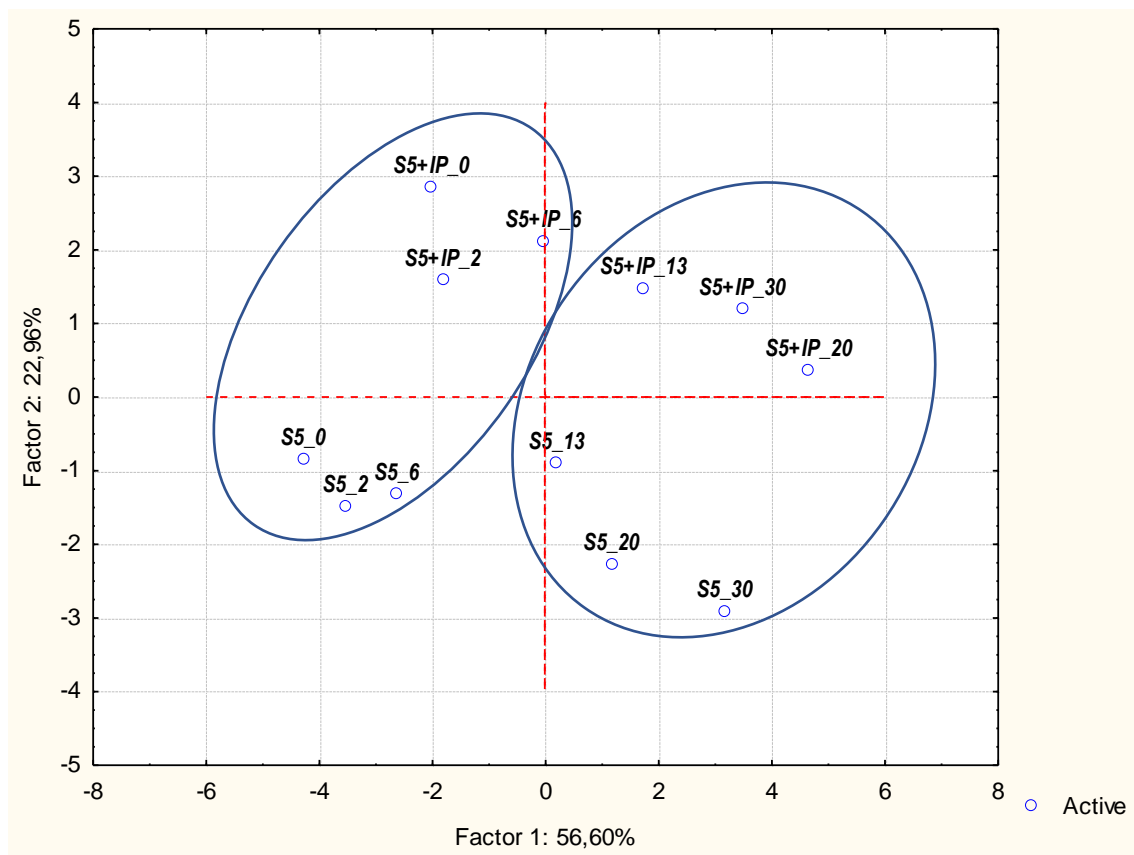


Figura 41 - Projeção espacial das amostras (S5 e S5+IP), no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

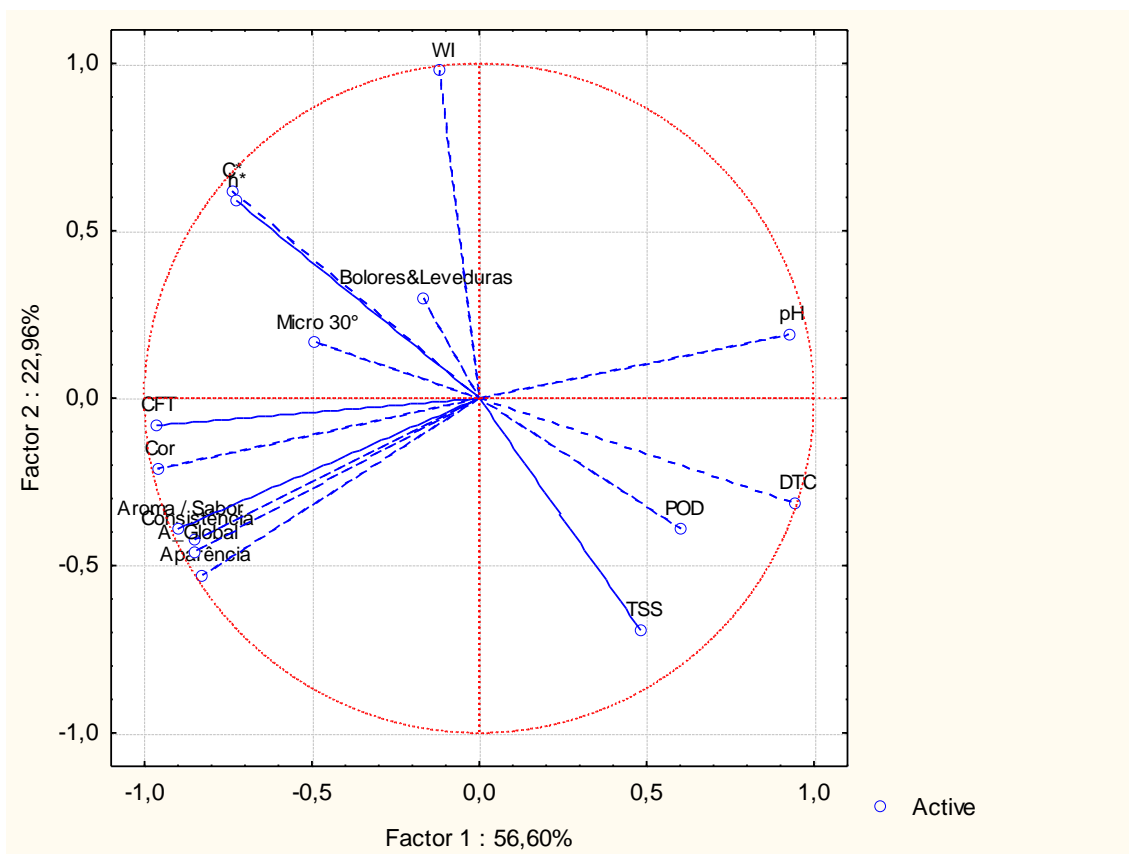


Figura 42 - Projecção espacial dos atributos avaliados nas amostras (S5 e S5+IP), no plano definido pelas duas primeiras componentes principais.

5.3.3.8 Viscosidade

Os resultados da avaliação reológica das polpas S5 e S5+IP no dia 0 de armazenagem são apresentados na tabela 17, sendo apresentados os parâmetros k (índice de consistência) e n (índice de escoamento) a partir da linearização das curvas taxa de escoamento em função de viscosidade aparente (lei de potência). Verificou-se, tal como anteriormente (cf 5.1.4.7) que a introdução do isolado proteico é responsável pelo aumento da consistência da polpa S5.

Tabela 17–Consistência e índice de escoamento para as amostras S5 e S5+IP no dia 0.

Amostra	Consistência (K)	n
S5	251,7±55,9	0,04
S5+IP	293,2±105,5	0,19

5.3.4 Conclusão parcial

Na avaliação dos efeitos da armazenagem em condições de refrigeração (5 °C) na qualidade físico-química, microbiológica e sensorial das polpas S5 e S5+IP verificou-se que ao longo do período de 30 dias:

- A deterioração da qualidade sensorial, nomeadamente no que se refere à alteração da cor das polpas (parâmetros CIELab (h^* , C^* e TCD) e avaliação sensorial do atributo cor), bem como, à depreciação sensorial dos atributos consistência e aroma/sabor, sobretudo a partir do 13º dia.

- A manutenção dos valores de TSS das polpas (cerca de 12 °Brix) ao longo dos 30 dias, e uma ligeira alcalinização das polpas a partir do 13º dia (acréscimos de 0,3 unidades de pH).
- A diminuição do CFT das polpas, a partir do 13º dia, em cerca de 25% a 30% face aos teores iniciais.
- A regeneração da atividade da POD, a partir do 13º dia.
- A ausência de desenvolvimento microbiano significativo durante 30 dias de armazenagem com manutenção dos níveis de contaminação inicial (2 ciclos Log para os Mic. 30 °C e, < 1 ciclo Log para o grupo de bolores e leveduras).
- Uma clara preferência pela amostra S5 face à S5+IP através da avaliação sensorial por painel, verificando-se que os atributos consistência e aroma foram os principais responsáveis pela depreciação da polpa S5+IP. Com base no cálculo do índice de aceitabilidade (IA), concluiu-se que a polpa S5 apresentou boa aceitabilidade ao longo dos 30 dias (IA superior ≥ 70 %) enquanto que na polpa S5+IP essa condição só foi observada até ao 2º dia de armazenagem.

Foi novamente confirmado o aumento da consistência da polpa S5 pela introdução do isolado proteico na polpa S5+IP (ca de 0,66%).

6 Conclusões Gerais

- A introdução dos hortícolas - salsa e espinafre, numa mistura base de frutos (56,25% maçã, 18,75% de pera, 25% de ananás), nas proporções 5% para a salsa (S5) e 10% para o espinafre (E10), revelou-se importante para cumprir os objetivos inicialmente estabelecidos:
 - Obter uma polpa de tonalidade verde com relativa estabilidade do pigmento clorofila, com níveis de aceitação sensorial favoráveis e com valor de $\text{pH} < 4,5$ (contribuição para estabilidade microbiana da polpa durante a armazenagem).
 - O teor de sólidos solúveis diminui pela introdução dos hortícolas, mas manteve valores na gama de 12 a 13 °Brix, correspondentes a níveis mínimos para a perceção de doçura. O nível de TSS da polpa mostrou-se muito dependente do TSS dos frutos que compõem a mistura base, no caso, do ananás que foi o fruto que apresentou valores de TSS muito variáveis (10 a 14 °Brix).
 - A introdução dos hortícolas contribui ainda para o incremento significativo do teor de compostos fenólicos totais (duplicação dos valores de CFT, face à mistura base) cujo acréscimo na atividade antioxidante se revela importante quer para a inibição de oxidações durante a armazenagem quer para o valor funcional da polpa (38 mg eq. ác. gálico.100 g⁻¹ e 50 mg eq. ác. gálico.100g⁻¹, para a S5 e E10, respetivamente).
 - A polpa S5 foi a formulação selecionada com base no critério da avaliação sensorial pelo contributo aromático associado à salsa ter sido muito valorizado.

- II. Da otimização das condições de pasteurização testadas (ΔT [80 a 98 °C], Δt [0-25 min]) para a polpa S5 (5% salsa) foi possível verificar:
- Efeitos significativos na alteração das características sensoriais (CIELab), redução da contaminação microbológica (mesófilos e bolores e leveduras) e níveis de atividade da peroxidase (POD) na dependência do binómio T/t utilizado.
 - Para todos os binómios testados houve uma influência marginal na alteração dos parâmetros de pH, TSS e CFT (variações máximas de 0,1 unidade, de 1,2°Brix e de 3,4 mg de eq. ácido gálico*100g⁻¹, respetivamente).
 - As variações da tonalidade (h^*) e da inativação da PPO (POD %) foram ajustados a modelos cinéticos (1ª ordem) em que os parâmetros de degradação em função da temperatura obedecem à relação de Arrhenius.
 - Os parâmetros cinéticos obtidos (E_a , K_{ref} e C_0) para a alteração da tonalidade foram: $C_0=111.9$; $K_{ref}=0,02$ e $E_a=5,7$ kJ.mol⁻¹, e para a inativação da POD foram: $C_0=101.9$; $K_{ref}=0,35$ e $E_a=116,4$ kJ.mol⁻¹
 - A energias de ativação (E_a) para o fenómeno de inativação da POD foi cerca de 20 vezes superior ao obtido para a variação da tonalidade (h^*) traduzindo a maior dificuldade no fenómeno de inativação enzimática face à alteração da cor da polpa.
 - Na condição de pasteurização otimizada (binómio 90 °C/10 min) verificou-se a inativação dos níveis de POD superior a 90% e a redução da contaminação microbiana inicial em cerca de 2 ciclos Log (UFC.g⁻¹ de mic. 30 °C).
- III. A introdução de isolado proteico (IP, 82,3%) alterou significativamente a cor das polpas (aumento do WI), aumentou de forma ligeira a respetiva consistência ($k=281$ vs $K=215$, para S5+IP e S5, respetivamente) e apresentou níveis de aceitação sensorial favoráveis, antes e após a pasteurização (binómio 90 °C/10 min). No entanto, a pasteurização exerceu um ligeiro efeito no aumento da consistência desta polpa.
- IV. Da avaliação dos efeitos da armazenagem (5 °C; 30 dias) na qualidade físico-química, microbológica e sensorial das polpas S5 e S5+IP, pasteurizadas na condição otimizada (90 °C/10 min) conclui-se que ambas:
- Manifestaram uma continua deterioração da qualidade sensorial no que respeita à alteração da cor (avaliação instrumental e sensorial) e à depreciação dos atributos consistência e aroma/sabor (avaliação sensorial) com variação mais pronunciada a partir do dia 13.
 - Não sofreram alteração dos valores de TSS iniciais (cerca de 12 °Brix), ocorrendo uma ligeira tendência de alcalinização a partir do 13º dia (acréscimos de 0,3 unidades).

- Verificaram a diminuição do CFT, em cerca de 25% a 30%, face aos teores iniciais, com significado a partir do 13º dia.
- Manifestaram ausência de desenvolvimento microbiano significativo durante 30 dias com (manutenção dos níveis de contaminação de 2 ciclos Log para os Mic. 30 °C e, < 1 ciclo Log para o grupo de Bolores e Leveduras).
- A degradação da qualidade das polpas, nomeadamente da cor e da composição fenólica poderá ser atribuída à atividade enzimática uma vez que se verificou a regeneração da POD nas fases finais do armazenamento.
- A preferência sensorial pela polpa S5 face à S5+IP, foi principalmente atribuída à depreciação do aroma e da consistência manifestada pela última.
- Ambas as polpas reúnem, durante 30 dias, os requisitos de estabilidade microbiológica e enzimática inicialmente estabelecidos. No entanto, tendo em conta a introdução do critério sensorial preveem-se períodos de vida útil de 13 dias e de 30 dias para as polpas S5+IP e S5, respetivamente.

7 Referências bibliográficas

- Afonso, M. et al. 1997. "Determinação de Propriedades Térmicas de Frutos Tropicais : Polpa e Néctar de Cupuaçu (Theobroma Grandiflorum) e de Açaí (Euterpe." : 1997).
- Alexandre, Deise, and Rosiane L Cunha. 2004. "Conservação Do Açaí Pela Tecnologia de Obstáculos." 24(1): 114–19.
- Do Amaral Santos, Cristina Auler, Solange Cristina Carreiro, and Ana Flavia Santos Coelho. 2008. "Microbiological Evaluation of Frozen Fruit Pulps." *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 28(4): 913–15.
- Barbin, Douglas Fernandes, Lincoln Camargo Neves Filho, and Vivaldo Silveira Junior. 2009. "Processo de Congelamento Em Túnel Portátil Com Convecção Forçada Por Exaustão e Insuflação Para Paletes." *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* 29(3): 667–75.
- Bifani, Valerio, Javier Inostroza, María José Cabezas, and Mónica Ihi. 2002. "Determinación de Parámetros Cinéticos de Peroxidasa y Clorofila a En Judías Verdes (Phaseolus Vulgaris Cv. Win) y Estabilidad Del Producto Congelado." *Afinidad: Revista de química teórica y aplicada*, ISSN 0001-9704, Vol. 59, No. 497, 2002, págs. 57-64 59(497): 57–64.
- BOUN, H.R., and C.C. HUXSOLL. 1991. "Control of Minimally Processed Carrot (Daucus Carota) Surface Discoloration Caused by Abrasion Peeling." *Journal of Food Science* 56(2): 416–18.
- Brasil Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2000. "Instrução Normativa n 7 de Janeiro de 2000." *Diário Oficial [da] União*: 1–26. <http://www.agricultura.gov.br/legislacao>.
- Brites, A et al. 2010. "Altas Pressões Na Indústria Alimentar." *Trabalho acadêmico, Instituto ...*: 1–25.
- Carla, Ana, and Alves Pelais. 2008. "Estudo Da Pasteurização Da Polpa De Muruci *." (550785): 17–24.
- Costa, Denise O., Gildene R. Cardoso, and Geandra M. V. Silva. 2013. "A Evolução Do Setor Produtivo e Comercialização de Polpa de Fruta No Brejo Paraibano : Estudo de Caso Na COAPRODES." *Xxxiii Encontro Nacional De Engenharia De Produção*: 1–16.
- Couto, Cristina Efimovna do. 2016. "Chlorophyll and Green Color Stabilization on Vegetable Homogenates."
- Crumière, Fabienne. 2000. "Inhibition of Enzymatic Browning in Food Products Using Bio-Ingredients." : 104.
- Dembitsky, Valery M. et al. 2011. "The Multiple Nutrition Properties of Some Exotic Fruits: Biological Activity and Active Metabolites." *Food Research International*.
- Drlange. 1994. *Colour Review. Drlange Application Report No. 8.0e.USA.*

- Dutcosky, S. D. 2007. *Análise sensorial de alimentos*. Curitiba: Champagnat.
- Fellows, P. J. 2000. *Food processing technology* Food Processing Technology.
- Ferraz, A. 1998. "Adaptação Ambiental No Sector Dos Lacticínios." *AIP Ambiente* 22: 22.
- Firmino, Fernanda Cristina. 2010. "Suco de Uva Enriquecido Com Soro: Elaboração e Aceitabilidade Sensorial." *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes* 65(373): 20–24.
- Fortitech. 2011. *Fortitech Strategic Nutrition*. CEC Media & Marketing Communications.
- Freitas, AC., e Figueiredo, P. 2000. *Conservação de Alimentos*.
- Fruta Feia. 2018. "Gente Bonita Come Fruta Feia." <https://frutafeia.pt/> (June 27, 2019).
- Galani, Y.J.H.; Mankad, M.P.; Shah, A.K.; Patel, N.J.; Acharya, R.R.; Talati, J.G. Effect of Storage Temperature on Vitamin C, Total Phenolics, UPLC Phenolic Acids profile and Antioxidant Capacity of Eleven Potato (*Solanum tuberosum* L.) Varieties. *Hortic. Plant J.* 2017, 3, 73–89.
- Hagenmaier, R.D., Baker, R.A. (1998). Microbial population of shredded carrot in modified atmosphere packaging as related to irradiation treatment. *Journal of Food Science*, 63 (1), pp 162-164.
- Haque, Emily, and Rattan Chand. 2008. 227 *European Food Research and Technology* Antihypertensive and Antimicrobial Bioactive Peptides from Milk Proteins. Springer-Verlag.
- Haraguchi, Fabiano Kenji, Wilson César de Abreu, and Heberth de Paula. 2008. "Proteínas Do Soro Do Leite : Composição , Propriedades Nutricionais , Aplicações No Esporte e Benefícios Para a Saúde Humana." *Revista de Nutrição* 4(19): 479–88.
- Hassimotto, N. M A, M. I. Genovese, and Franco Maria Lajolo. 2009. "Antioxidant Capacity of Brazilian Fruit, Vegetables and Commercially-Frozen Fruit Pulps." *Journal of Food Composition and Analysis* 22(5): 394–96.
- Horst, Maria Aderuza, and Fernando Salvador Moreno. 2009. "Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes: Carotenoides." *International Life Sciences Institute, Brasil* 6: 36.
- Juliano, Pablo et al. 2010. "Polymeric-Based Food Packaging for High-Pressure Processing." *Food Engineering Reviews* 2(4): 274–97.
- Kosikowski, Frank V. 1979. "Whey Utilization and Whey Products." *Journal of Dairy Science* 62(7): 1149–60.
- Kramer, George F., and Chien Y. Wang. 1989. "Correlation of Reduced Chilling Injury with Increased Spermine and Spermidine Levels in Zucchini Squash." *Physiologia Plantarum* 76(4): 479–84.

- Luiz, R. C., Hirata, T., Clemente, E. 2007. "Kinetic of inactivation of polyphenoloxidase and peroxidase of avocado (*Persea americana* Mill.)."
- Maria Streit, Nivia et al. 2005. "As Clorofilas." (3): 748–55.
- Marques, Luísa. 2011. "A Conservação Dos Alimentos." : 1–3.
- Martins, Luisa Louro, and Jorge Carvalho Nunes. 1997. "Caraterização e Inativação Térmica Da Peroxidase Em Feijão Verde.Pdf."
- Martins, Margarida Moldão. 2007. "Produtos Minimamente Processados. Definições, Processamento e Fatores de Qualidade."
- Melo, A A M, E V de B V Boas, and Cristina Filomena Justo. 2009. "Use of Chemical Additives for Postharvest Conservation of Fresh Cut 'Apple' Banana = Uso de Aditivos Químicos Paraa Conservação Pós-Colheita de Banana 'Maçã' Minimamente Processada." *Ciencia e Agrotecnologia* 33(1): 228–36.
- Miranda, Ricardo Miguel dos Santos. 2018. "Formulação de Uma Bebida à Base de Soro de Leite Com Péptidos Bioativos Ricardo."
- Moscatto, J.A. et al. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*, v.24, n.4, p.634-640, 2004.
- Neri-Numa, Iramaia Angélica, Renata A. Soriano Sancho, Ana Paula Aparecida Pereira, and Glaucia Maria Pastore. 2018. "Small Brazilian Wild Fruits: Nutrients, Bioactive Compounds, Health-Promotion Properties and Commercial Interest." *Food Research International*.
- Neves, Pedro. 2015. "Importância Dos Compostos Fenólicos Dos Frutos Na Promoção Da Saúde."
- Noa, Andreia. 2012. "EFEITOS DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE TRATAMENTO TÉRMICO E DE TEMPERATURA DE ARMAZENAGEM EM CONGELAÇÃO NA QUALIDADE DE POLPAS DE HORTOFRUTÍCOLAS."
- Pires Ramos, Natália et al. 2007. "QUALIDADE HIGIÊNICO-SANITÁRIA DE 10 AMOSTRAS DE POLPA DE AÇAÍ CONGELADA FABRICADA POR UMA INDÚSTRIA DO MUNICÍPIO DE JOÃO PESSOA." (2): 1–6.
- Regis, Auriana de Assis. 2015. 3 "ELABORAÇÃO DE NÉCTAR DE MARACUJÁ ADICIONADO DE SORO DE LEITE E FRUTOOLIGOSSACARÍDEO."
- Ribatejo, Agrocluster. 2015. "Tendências Do Mercado Alimentar Da União Europeia." *Agrocluster Portugal*: 67.
- Rice-Evans, Catherine A., Nicholas J. Miller, and George Paganga. 1997. "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds." *Trends in Plant Science*.

- Rockenbach II, Rodrigues E, Cataneo C, Gonzaga LV, Lima A, Mancini-Filho J, Fett R (2008) “Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis Peruviana* L. Alimentação e Nutrição”, Araraquara, 19, 3, 271-276.
- Rodrigues, Lígia R. 2015. “Valorização Da Fração Proteica Do Soro de Queijo.” (November).
- Rosenthal, Amauri, and Rosires Deliza. 2016. “Pineapple Purée Processed Using High.” (August).
- Roy, Molay Kumar, Makiko Takenaka, Seiichiro Isobe, and Tojiro Tsushida. 2007. “Antioxidant Potential, Anti-Proliferative Activities, and Phenolic Content in Water-Soluble Fractions of Some Commonly Consumed Vegetables: Effects of Thermal Treatment.” Food Chemistry.
- Rucker, Robert B. 2008. “Vitamins Learn More about Ascorbic Acid Ascorbic Acid.”
- Santos, Diana I. 2012. “Desenvolvimento de Polpa Hortofrutícola. Polpa Verde Com Elevada Bioatividade.”
- Santos, Valéria et al. 2012. “Escurecimento Enzimático Em Frutas.” VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação: 5.
- Schanda, János., and International Commission on Illumination. 2007. Colorimetry : Understanding the CIE System. CIE/Commission internationale de l’éclairage.
- Schiozer, A. L, and L. E. S.; Barata. 2007. “Estabilidade de Corantes e Pigmentos de Origem Vegetal Stability of Natural Pigments and Dyes Resumo.” Revista Fitos 3.
- Sgarbieri, Valdemiro Carlos. 2004. “Propriedades Fisiológicas-Funcionais Das Proteínas Do Soro de Leite.” Revista de Nutricao 17(4): 397–409.
- Silva, Beatriz Santos da. 2016. “ESTUDO CINÉTICO DE SECAGEM DE ABÓBORA (*Cucurbita Moschata*) in Natura E SUBMETIDA AO CONGELAMENTO.”
- Silva, M, and A Frutoso. 2000. “Os Contratos de Adaptação Ambiental.” AEP Ambiente 41: 16–21.
- Sorice, Angela et al. 2014. “Ascorbic Acid: Its Role in Immune System and Chronic Inflammation Diseases.” Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 14(5): 444–52.
- Soutinho, S. 2012. “Avaliação dos Compostos Fenólicos e da Actividade Antioxidante de Frutos Vermelhos Produzidos em modo Biológico.”
- Souza Sant’Ana, Anderson. 2011. “Special Issue on Exotic Fruits.” Food Research International.
- Souza, Vanessa Rodrigues Duarte de. 2017. “Tratamento Térmico Com Vapor e Adição de Xantana Para Preservação de Compostos Bioativos Fenólicos e Da Atividade Antioxidante de Polpas de Mirtilo.”

- Spadoti, Leila Maria et al. 2009. "Peptídeos Bioativos Obtidos de Proteínas Do Soro de Queijo: Potenciais Ingredientes de Alimentos Promotores de Saúde." *Revista Indústria de Laticínios*: 80–83.
- Stahl, Wilhelm, and Helmut Sies. 2005. "Bioactivity and Protective Effects of Natural Carotenoids." In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, , 101–7.
- Swain, T., and W. E. Hillis. 1959. "The Phenolic Constituents Of *Prunus Domestica*. I.—The Quantitative Analysis of Phenolic Constituents." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10(1): 63–68.
- Teixeira, J. A. 2003. "Processos Para a Valorização Do Soro de Queijo." : 5–10.
- Teixeira, L. V., L. M. Fonseca, and L. D.M. Menezes. 2007. "Avaliação Da Qualidade Microbiológica Do Soro de Queijos Minas Padrão e Mozzarella Produzidos Em Quatro Regiões Do Estado de Minas Gerais." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59(1): 264–67.
- Vicini, L., 2005. *Análise multivariada da teoria à prática*. Santa Maria: UFSM, CCNE. 215p.
- Walzem, Rosemary L. 1999. "Propriedades Benéficas à Saúde Das Proteínas de Soro e Frações de Soro." *Produtos e bebidas nutricionais*. Texas A & M University: 1–8.
- Wu SJ, Tsai JY, Chang SP, Lin DL, Wang SS, Huang SN, Ng LT (2006) "Supercritical carbon dioxide extracts exhibits enhanced antioxidant and anti-inflammatory activities of *Physalis peruviana*." *Journal of Ethnopharmacology*, 108, 407-413.
- Zanatta, C. L., Zotarelli, M. F., Clemente, E. (2006). "Peroxidase (POD) e Polifenoloxidase (PPO) em Polpa de Goiaba (*psidium guajava* r.)." *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas. 26 (3), pp. 705-708.

ANEXOS

Anexo A - Folha de prova utilizada nos ensaios de pasteurização e de armazenamento

FICHA DE PROVA HEDÔNICA

NOME:

DATA:

Por favor, avalie as amostras de polpas utilizando a escala abaixo, em relação aos seguintes atributos.

Escala:

- 1--Desgostei muito
- 2- Desgostei
- 3--Não gostei nem desgostei
- 4--Gostei
- 5--Gostei muito

	Amostra	Código:
Características sensoriais		
Aparência		
Cor		
Consistência		
Aroma/sabor		
Apreciação Global		



EMG/MA/NA/PM/CR/M

Anexo B – Gráficos referentes à análise sensorial do ensaio de armazenamento

Dia 0

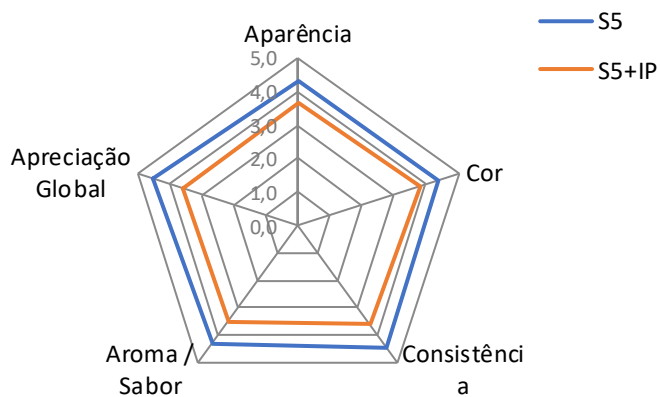


Figura B1- Resultados da prova hedônica no dia 0 de armazenamento.

Dia 2

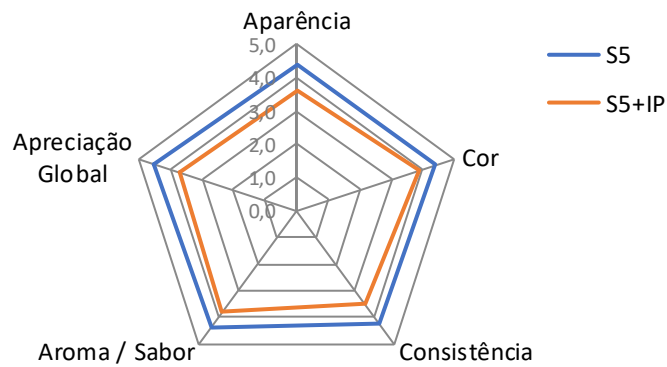


Figura B2- Resultados da prova hedónica no dia 2 de armazenamento.

Dia 6

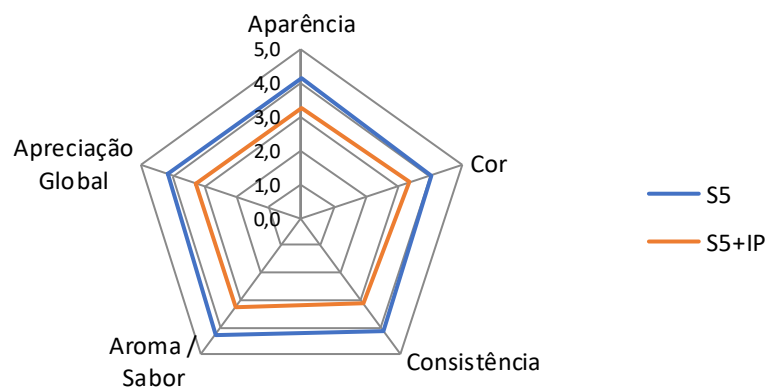


Figura B3 - Resultados da prova hedónica no dia 6 de armazenamento.

Dia 13

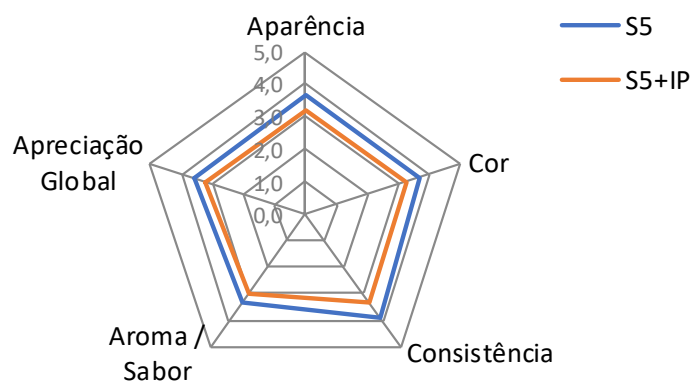


Figura B4 - Resultados da prova hedónica no dia 13 de armazenamento.

Dia 30

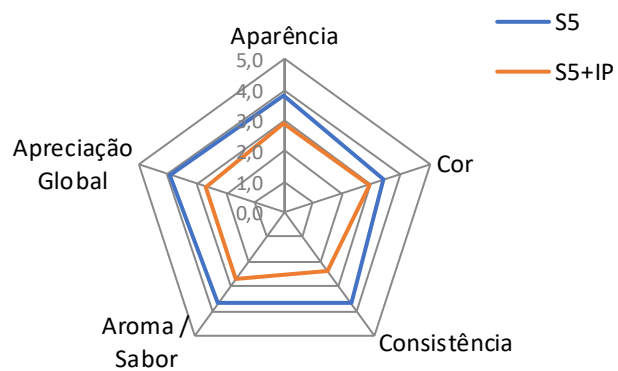


Figura B5 - Resultados da prova hedônica no dia 30 de armazenamento.